

**Aus der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Tim Pohlemann**

**Etablierung und Charakterisierung eines Co-Kultur-Modells
aus humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen
und humanen Perizyten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2016**

vorgelegt von:
Gerrit Simon Schneider
geboren am 31. März 1988
in Erkelenz

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
Summary	4
2. Einleitung	6
2.1 Die Bedeutung des Weichteilschadens beim Menschen	6
2.2 Weichteilschaden	9
2.2.1 Definition und Ätiologie	9
2.2.2 Physiologie der Weichteilheilung	10
2.2.3 Pathophysiologie der Weichteilheilung	15
2.2.4 Therapeutische Ansätze	17
2.3 Relevanz der Endothelzelle für die Weichteilheilung	18
2.4 Relevanz des Perizyten für die Weichteilheilung	19
2.5 Erythropoietin in der Weichteilheilung	21
2.6 Experimentelle Modelle zur Weichteilheilung	22
2.7 Fragestellung	23
3. Material und Methodik	24
3.1 Überblick	24
3.2 Zellkultivierung	24
3.2.1 Kultivierung humaner dermalen mikrovaskulärer Endothelzellen	25
3.2.2 Kultivierung humaner Perizyten	27
3.2.3 Co-Kultivierung beider Zelltypen	28
3.3 Generelles experimentelles Setup/Co-Kultur-Assay	30
3.4 Hypoxie	33
3.5 Immunfluoreszenzfärbung	34
3.5.1 Prinzip	34
3.5.2 Antikörper	34
3.5.3 Durchführung	38
3.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	41

3.6.1 Funktionsprinzip und Aufbau des Fluoreszenzmikroskopes	41
3.6.2 Auswertung	42
3.7 ELISA	44
3.7.1 Prinzip	44
3.7.2 Quantifizierung von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)	45
3.7.3 Quantifizierung von VEGF (vascular endothelial growth factor)	46
3.8 Statistische Auswertung	47
3.9 Geräte	48
3.10 Verbrauchsmaterialien	49
4. Ergebnisse	51
4.1 Spaltschluss	51
4.1.1 Mono-Kulturen	51
4.1.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	51
4.1.1.2 Humane Perizyten	52
4.1.2 Co-Kultur	53
4.1.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur	54
4.2 Proliferation: Zelldichte	57
4.2.1 Mono-Kulturen	57
4.2.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	57
4.2.1.2 Humane Perizyten	58
4.2.2 Co-Kultur	59
4.2.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur	60
4.3 Proliferation: Ki-67/MIB-1	62
4.3.1 Mono-Kulturen	62
4.3.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	62
4.3.1.2 Humane Perizyten	63
4.3.2 Co-Kultur	64
4.3.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur	65
4.4 Apoptose	66
4.4.1 Mono-Kulturen	66
4.4.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	66
4.4.1.2 Humane Perizyten	67
4.4.2 Co-Kultur	68

4.4.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur	69
4.5 Myofibroblastendifferenzierung	70
4.5.1 Humane Perizyten in Mono-Kultur	70
4.5.2 Humane Perizyten in Co-Kultur	70
4.5.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur	70
4.6 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	72
4.6.1 Mono-Kulturen	72
4.6.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	72
4.6.1.2 Humane Perizyten	73
4.6.2 Co-Kultur	74
4.7 Vascular endothelial growth factor (VEGF)	75
5. Diskussion	76
6. Anhang	90
Literaturverzeichnis	90
Publikationen	107
Danksagung	108

Abkürzungsverzeichnis

4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid	DAPI
Abbildung	Abb.
alpha-smooth muscle actin	α -SMA
Angiopoetin-1	Ang-1
basic fibroblast growth factor	bFGF
Bovines Serumalbumin	BSA
co-culture scratch wound migration assay	CCSWMA
Dalton	Da
Endothelzell-Wachstumsmedium	ECG-MV
enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA
epidermal growth factor	EGF
Erythropoietin	EPO
extracellular matrix	ECM
fibroblast growth factor-2	FGF-2
Fluoresceinisothiocyanat	FITC
goat anti-mouse	GAM
goat anti-rabbit	GAR
granulocyte-macrophage colony stimulating factor	GM-CSF
Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen	HDMEC
Humane Perizyten	HPC
hypoxia inducible factor-1 alpha	HIF-1 α
insulin-like growth factor	IGF
Interleukin	IL
International Units pro ml	IU/ml
Kaliumchlorid	KCl
Ki67-Antigen	Ki67
Master Cell Bank	MCB
Matrix Metalloproteinase	MMP
MIB-1-Antikörper (Molecular Immunology Borstel number 1)	Ki-67/MIB-1
monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1
Myofibroblast	MF
normale humane dermale Fibroblasten	NHDF

Objektträger	OT
Passage der Zellkultur	P
PBS/0,5 % Tween 20	PBS-T
Perizytenzell-Wachstumsmedium	PCGM
phosphatgepufferte Salzlösung	PBS
platelet-derived growth factor	PDGF
Raumtemperatur	RT
reaktive Sauerstoffspezies	ROS
Rezeptor	R
Sauerstoffpartialdruck	pO_2
stem cell factor	SCF
stromal cell derived factor-1	SDF-1
Stunden	h
Tabelle	Tab.
tissue inhibitors of matrix metalloproteinases	TIMP
transforming growth factor	TGF
Tumornekrosefaktor alpha	TNF- α
Umdrehungen pro Minute	U/min
vascular endothelial growth factor	VEGF
von-Willebrand-Faktor	vWF
Weibel-Palade bodies	WPB

1. Zusammenfassung

Der demographische Wandel hat zur Folge, dass sich die Gesellschaft aufgrund der steigenden Lebenserwartung mit einer wachsenden Anzahl an chronischen und verzögert heilenden Wunden konfrontiert sieht. Neben der immer komplexeren medizinischen Versorgung stellen die steigenden Behandlungskosten eine weitere Herausforderung dar, die in Zukunft bewältigt werden muss. In der zurückliegenden Zeit entstanden zahlreiche In-vitro-Untersuchungen, tierexperimentelle Arbeiten und klinische Studien, deren Ergebnisse der Weiterentwicklung von Behandlungsmöglichkeiten chronischer Wunden dienten. Um jedoch weiterhin effiziente Therapien entwickeln zu können, ist das grundlegende Verständnis der zellulären Vorgänge während der Weichteilheilung von besonderer Wichtigkeit. Infolgedessen gibt es einen besonderen Bedarf an weiteren In-vitro-Versuchsmodellen, die die zelluläre Interaktion im Hinblick auf verschiedene Einflussfaktoren beschreiben können. Insbesondere sind hier Endothelzellen und Perizyten sowie ihr α -smooth-muscle-actin(α -SMA)-positiver Subtyp zu nennen, der die Weichteilheilung durch die Wundkontraktion und Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix möglicherweise unterstützen kann.

In der Literatur lassen sich zwar Modelle zur Untersuchung der zellulären Interaktion dieser Zelltypen im Zusammenhang mit der Angiogenese finden, allerdings ist dort der Fokus nur unzureichend auf die komplexen Prozesse während der Weichteilheilung gelegt. Daher etablierten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen In-vitro-Assay durch Co-Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und humanen Perizyten (HPC) zur Untersuchung der Zellinteraktion vor dem Hintergrund der humanen Weichteilheilung.

Dieser Assay bildet die Weiterentwicklung eines bereits etablierten Co-Kultur-Assays (co-culture scratch wound migration assay = CCSWMA) aus humanen Endothelzellen und Fibroblasten. In der vorliegenden Arbeit wurden Migration, Proliferation, Apoptose, Expression von α -SMA und zusätzlich die Ausschüttung von für die Weichteilheilung bedeutsamen Wachstumsfaktoren, wie monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) und vascular endothelial growth factor (VEGF) untersucht. Dies geschah unter dem Einfluss von Normoxie und Hypoxie sowie des potenziellen Therapeutikums, Erythropoietin (EPO), jeweils Mono- und Co-Kulturen vergleichend.

Die Ergebnisse zeigten, dass die direkte Co-Kultivierung von HDMEC und HPC prinzipiell möglich ist und im Rahmen eines In-vitro-Modells vor dem Hintergrund der Weichteilheilung unter festgelegten Kriterien verwendbar ist. Es ergaben sich charakteristische Unterschiede beim Vergleich co- und mono-kultivierter Zellen. In der Gesamtbetrachtung der Daten zur Proliferation zeigte sich eine gegenseitige Hemmung auf den jeweils anderen Zelltyp bei der Co-Kultivierung. So war z.B. die initiale Proliferationsrate der HDMEC, bestimmt mit Ki-67/MIB-1, in Mono-Kultur höher als die der HDMEC in Co-Kultur. Bezüglich der HPC zeigte sich dieser Effekt zum späten Zeitpunkt der Kultivierung. Ein weiterer Effekt der Co-Kultivierung zeigte sich in erhöhten MCP-1-Werten im Mediumüberstand: Während bei HDMEC eine maximale Ausschüttung von 233 ng/10⁶ Zellen und bei HPC von 12 ng/10⁶ Zellen detektiert werden konnte, lag sie in der Co-Kultur bei 305 ng/10⁶ Zellen. Zum initialen Zeitpunkt hatte die Co-Kultivierung eine dämpfende Wirkung auf die Apoptose der HDMEC.

Der Anteil α -SMA-positiver HPC war unter Co-Kultur-Bedingungen generell höher als in Mono-Kultur und zeigte zum späten Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied: In Co-Kultur waren 50 % der HPC α -SMA-positiv, während der Anteil in Mono-Kultur nur 25 % betrug. Dies weist darauf hin, dass HDMEC in vitro lokal die Entstehung und Persistenz α -SMA-positiver HPC begünstigen.

Der Effekt der Hypoxie zeigte sich im Modell deutlich darin, dass unter Co-Kultur-Bedingungen nach 18 h Normoxie eine Zelldichte von 306 Zellen/mm² vorhanden war, während unter Hypoxie nur eine Zelldichte von 209 Zellen/mm² erreicht wurde. Die Supplementierung mit EPO hatte darauf keinen Einfluss. Hingegen war unter EPO-Gabe die Ausschüttung von MCP-1 unter Hypoxie mit 83 ng/10⁶ Zellen signifikant erniedrigt gegenüber der Ausschüttung unter Normoxie mit 197 ng/10⁶ Zellen. Dies kann im Sinne eines migrations- und proliferationsfördernden Effekts von EPO unter Hypoxie interpretiert werden. Unterstützt wird diese Annahme zusätzlich durch die Tatsache, dass bei Gabe von EPO unter hypoxischen Verhältnissen die Apoptose-Rate innerhalb der Co-Kulturen signifikant niedriger war als innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen.

In der Gesamtinterpretation der In-vitro-Ergebnisse lassen sich Rückschlüsse auf die Interaktion von Endothelzellen und Perizyten im Rahmen der Weichteilheilung in vivo ziehen. Die Ergebnisse liefern daher einen weiteren Beitrag zum grundlegenden Verständnis der Prozesse auf Zellebene innerhalb der Weichteilheilung.

Das hier etablierte In-vitro-Versuchsmodell bietet auch in Zukunft die Möglichkeit, das Verhalten von Endothelzellen und Perizyten unter Co-Kultur-Bedingungen und dem Einfluss multipler Faktoren standardisiert zu untersuchen. Dabei können die verschiedenen zu untersuchenden Komponenten variiert werden, um Zelltyp-spezifische oder pharmazeutisch-therapeutische Effekte zu überprüfen und darzustellen. Somit können mit Hilfe des Modells physiologische und pathophysiologische Zusammenhänge auf Basis der zellulären Interaktion vor dem Hintergrund der humanen Weichteilheilung charakterisiert werden.

Summary

Due to an increasing life expectancy society is facing a growing number of chronic wounds and those with a delayed healing process. In addition to the increasingly complex medical care the rising treatment costs are another challenge that must be dealt with in the future. In the past numerous in vitro studies, animal experimental studies and clinical trials were performed in order to develop novel treatments for chronic wounds. To further establish effective therapies the basic understanding of cellular processes occurring during soft tissue healing is of particular importance. There is thus a special need for additional in vitro experimental models which are able to describe the cellular interaction in response to various factors. In particular, endothelial cells and pericytes and their α -smooth-muscle-actin(α -SMA) positive subtype have to be mentioned, the latter probably supporting soft tissue healing by wound contraction and synthesis of components of the extracellular matrix. The literature mainly consists of models for the examination of the cellular interaction of these cell types mainly associated with angiogenesis, but less is known with respect to the cells' function with respect to soft tissue healing. Therefore in the present work we established an in vitro assay by co-cultivation of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC) and human pericytes (HPC) to study cell interaction in the context of human soft tissue healing.

This assay is based on a well-established co-culture assay (co-culture scratch wound migration assay = CCSWMA) consisting of human endothelial cells and fibroblasts. In the present study migration, proliferation, apoptosis rate, the expression of α -SMA and the release of soft tissue healing related growth factors such as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed. This was done under the influence of both normoxia and hypoxia and the potentially effective therapeutic agent erythropoietin (EPO). In addition mono- and co-cultures were compared.

The results showed that the direct co-culture of HDMEC and HPC is possible and that the in vitro model is applicable in the context of soft tissue healing using established criteria. Several differences became apparent when comparing co- and mono-cultured cells. Proliferation analysis showed a mutual inhibition of the other cell type in co-culture: The initial proliferation rate of HDMEC determined by Ki-67/MIB-1 was higher in mono-culture than in co-culture. With regard to HPC the same effect was detectable at a later

time point during cultivation. Another effect of co-culture was apparent by elevated MCP-1 levels analyzed in the medium supernatant: While in the case of HDMEC a maximum secretion of 233 ng/10⁶ cells and in the case of HPC of 12 ng/10⁶ cells was detected, the MCP-1 level was 305 ng/10⁶ cells in the co-culture. Initially the co-cultivation had an attenuating influence on HDMEC apoptosis.

The percentage of α -SMA-positive pericytes was generally higher in co-culture compared to the mono-culture and showed a significant difference at the latest time point: In co-culture 50 % of HPC were α -SMA-positive, while the proportion in mono-culture was only 25 %. This indicates that HDMEC may locally promote the formation and persistence of α -SMA-positive pericytes in vitro.

The effect of hypoxia was clearly visible under co-culture conditions: After 18 h normoxia a cell density of 306 cells/mm² was present while under hypoxia only a cell density of 209 cells/mm² was achieved. In this context EPO-supplementation had no influence. In contrast subsequent to EPO-supplementation the secretion of MCP-1 under hypoxia was significantly decreased to 83 ng/10⁶ cells when compared to the secretion under normoxia with 197 ng/10⁶ cells. This can be interpreted in terms of a migration and proliferation-promoting effect of EPO under hypoxia. This assumption is also supported by the fact that upon addition of EPO under hypoxic conditions the apoptosis rate in the co-cultures was significantly lower than in the HDMEC-mono-cultures.

Finally several conclusions with respect to the interaction of endothelial cells and pericytes in the context of soft tissue healing in vivo can be drawn from the in vitro results. The results also make a contribution to the fundamental understanding of the processes occurring at the cellular level within soft tissue healing.

The established experimental in vitro model offers the possibility to examine the behavior of endothelial cells and pericytes under co-culture conditions and to analyze the influence of multiple factors in a standardized manner in the future. The components to be tested can be varied in order to investigate and describe cell-type specific or pharmaco-therapeutic effects. Thus by the application of this model in the context of human soft tissue healing, physiological and pathophysiological processes based on cellular interaction can be characterized.

2. Einleitung

2.1 Die Bedeutung des Weichteilschadens beim Menschen

Der demographische Wandel hat zur Folge, dass die Behandlung von chronischen Wunden im Rahmen der medizinischen Versorgung der Bevölkerung mit zunehmender Zeit einen immer größeren Stellenwert einnimmt. Über 4 Millionen Menschen in Deutschland leiden Schätzungen zufolge an chronischen Wunden (Dill-Müller & Tilgen 2005). Das Lebensalter ist in diesem Zusammenhang als potenzieller Risikofaktor für die Entstehung und Persistenz chronischer Wunden anzusehen. Weiterhin sind die oftmals langen Behandlungszeiträume für die Betroffenen durch eine hohe Rate an Rezidiven und eine starke Reduzierung der Lebensqualität gekennzeichnet. Die Behandlungskosten betragen dabei, Stand 2008, ca. acht Milliarden Euro pro Jahr in Deutschland (Janßen & Becker 2008). Die genannten Faktoren stellen die Gemeinschaft sowie das Gesundheitssystem vor ständig neue Herausforderungen. Die erforderlichen Maßnahmen zur Steigerung der Effizienz liegen insbesondere in der Anwendung moderner Wundversorgung (Janßen & Becker 2008).

Die Wundheilung kann durch zahlreiche Faktoren in vielerlei Hinsicht beeinflusst werden. Dabei lassen sich lokale und systemisch wirksame Faktoren voneinander unterscheiden. Die lokale Sauerstoffsättigung im heilenden Gewebe nimmt hierbei eine Sonderstellung ein. Nicht nur, dass die vorübergehende lokale Hypoxie nach einem Weichteilschaden die Wundheilung induziert (Hopf & Rollins 2007), auch ist sie von großer Bedeutung für zahlreiche weitere Prozesse. So stellt sie den adäquaten Reiz für die Neoangiogenese sowie für die Differenzierung und Migration zahlreicher an der Wundheilung beteiligter Zellen dar. Um die Heilung zu gewährleisten, muss die Dauer der Hypoxie allerdings begrenzt sein. Ein besonderes Merkmal von chronischen Wunden sind hypoxische Verhältnisse über einen langen Zeitraum, wie sie insbesondere bei Menschen in höherem Alter bzw. bei Patienten mit chronischen Gefäßerkrankungen, wie der peripheren, arteriellen Verschlusskrankheit, vorkommen (Chandan 2009). Dabei führt die geringe Sauerstoffsättigung im Gewebe u.a. zu einer verminderten Bildung von Superoxiden, die von immunkompetenten Zellen zur lokalen Abwehr pathogener Mikroorganismen benötigt werden, wodurch wiederum das Infektionsrisiko einer chronischen Wunde deutlich erhöht ist (Guo & DiPietro 2010). Eine Infektion wird durch die Tatsache unterstützt, dass Krankheitserreger zur Bildung von Biofilmen

neigen können, was eine antibiotische Therapie deutlich erschwert (Kirketerp-Møller et al. 2008).

Zusätzlich zu den vorwiegend lokal auf die Wundheilung wirksamen Faktoren lassen sich zusätzlich zur Alterung, welche u.a. zu einer deutlichen zeitlichen Verzögerung, jedoch nicht zur qualitativ minderwertigen Wundheilung führt (Gosain & DiPietro 2004), einige weitere systemische Faktoren anführen.

Durch die Wirkung von Sexualhormonen kommt es unter den Geschlechtern zu Unterschieden während der Wundheilung, wobei insbesondere Männer häufiger unter chronischen Wunden leiden, da hier der positive Effekt der Östrogene hinter dem negativen Effekt der Androgene deutlich zurückbleibt (Hardman & Ashcroft 2008). Auch der Einfluss psychischer Faktoren bleibt zu berücksichtigen. Die durch psychischen Stress ausgelöste Dysregulation des Immunsystems, die sich u.a. in einer deutlich erhöhten Ausschüttung von Glukokortikoiden äußert, führt zu veränderten Wirkspiegeln von Zytokinen (Boyapati & Wang 2007).

Vor allem in den Industrienationen kommt ein besonderer Stellenwert den chronischen Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus zu, die insbesondere im Zusammenhang mit hypoxischen Gewebeverhältnissen zur signifikanten Beeinträchtigung der Wundheilung führen (Vincent et al. 2004). Zusätzlich sind Adipositas und mangelhafte Ernährung ohne ausreichende Versorgung mit Vitaminen, Mineralien, Kohlenhydraten und Proteinen kritische Faktoren für den Heilungsverlauf (Wilson & Clark 2004). Außerdem sind noch erbliche Komponenten wie ein Mangel an Gerinnungsfaktoren (Monroe & Hoffman 2012) und diverse Tumorerkrankungen im Hinblick auf die verzögerte Heilung zu berücksichtigen (Coussens & Werb 2002). Medikamente wie u.a. Chemotherapeutika und Analgetika sowie Alkohol- und Nikotinkonsum (Guo & DiPietro 2010) sind als weitere negative Faktoren der Wundheilung zu nennen.

Aus therapeutischer Perspektive steht die kausale Therapie der die Wundsituation negativ beeinflussenden prädisponierenden Grunderkrankung an erster Stelle. Zusätzlich sollte besonderes Augenmerk auf die Verminderung von Risikofaktoren durch gezielte Einstellung gelegt werden, wodurch z.B. die lokale Blutversorgung verbessert werden kann. Die weiteren therapeutischen Maßnahmen müssen an die individuellen Wundverhältnisse angepasst werden. In vielen Fällen kann in angepassten zeitlichen Intervallen ein gründliches Debridement, also das chirurgische Entfernen avitalen bzw. nekrotischen Gewebes, angeraten sein. Bei Infektionen kann eine

antibiotische Therapie indiziert sein, wobei diese je nach akuten oder chronischen Wundverhältnissen an das spezifische Erregerspektrum adressiert sein muss. Bei Wundverbänden lassen sich passive von aktiven Verbänden unterscheiden. Während passive Verbände das Wundmilieu zu kontrollieren versuchen, verändern aktive Wundverbände das biochemische Milieu, um eine günstigere Heilungssituation zu schaffen. Dabei sollen vor allem Mazeration, Austrocknung sowie der Einfluss mechanischer Scherkräfte bzw. Druck verhindert werden. Neben diesen grundlegenden heilungsfördernden Maßnahmen gibt es noch zahlreiche weitere therapeutische Möglichkeiten, die teils Anwendung finden, teils Gegenstand aktueller Forschungen sind. Dazu gehören u.a. Therapieregime mit Stammzellen, Wachstumsfaktoren, Sauerstoff, Vakuum, Laser, elektrischer Stimulation und Ultraschall (Mulder et al. 2014).

Die Pathophysiologie der Weichteilheilung stellt für die Forschung immer noch eine Herausforderung dar. Nicht nur, dass experimentelle In-vitro-Studien die In-vivo-Verhältnisse während der Weichteilheilung immer besser zu simulieren vermögen, so sind sie auch mit deutlich geringerem arbeitstechnischen Aufwand und höherer Kosteneffizienz als vergleichbare Tiermodelle realisierbar. Weiterhin bieten standardisierte Modelle die Möglichkeit, zahlreiche Parameter wie Hypoxie oder den Zusatz von Hormonen oder anderen Substanzen vergleichbar darzustellen. Dadurch wird nicht nur ein wesentlicher Beitrag zum Verständnis der Weichteilheilung geleistet, sondern auch der Weg für neue, individuelle und effektivere Therapiekonzepte geebnet.

2.2 Weichteilschaden

2.2.1 Definition und Ätiologie

Der Begriff Wunde ist definiert als ein pathologischer Zustand, bei dem Körpergewebe mit oder ohne Substanzverlust und entsprechender Funktionseinschränkung voneinander getrennt oder zerstört worden ist (Pschyrembel 260. Auflage 2004; Krüger & Wolfrum 2008). Wunden können ätiologisch in mehrere Gruppen eingeteilt werden. Zu diesen gehören u.a. traumatische bzw. unfallbedingte und iatrogene Wunden. Zu den traumatischen Wunden gehören in erster Linie mechanische Verletzungen durch äußere Gewalteinwirkung. Hierzu zählen insbesondere Abschürfungen, Blasen, Schnitt- und Hiebwunden, Stich- und Pfählungsverletzungen sowie Riss- und Kratzwunden. Weiterhin gehören dazu je nach Form der Gewalteinwirkung sowohl Prellungen, Quetschungen, Platz- und Schusswunden, Ablösungen (Decollement) als auch Bisswunden und Insektenstiche.

Thermische Verletzungen wie Verbrennung oder Erfrierungen werden genauso wie chemische Verletzungen durch z.B. Säuren oder Laugen ebenfalls den traumatischen Wunden untergeordnet. Im weiteren Sinne umfassen traumatische Wunden ebenso Verletzungen durch elektrischen Strom und radioaktive Strahlung.

Den iatrogenen Wunden sind solche Defekte zuzuordnen, die im Rahmen ärztlicher therapeutischer Maßnahmen wie Punktionen, Spalthautentnahmen und Operationen ihren Ursprung nehmen (Krüger & Wolfrum 2008).

Die physiologische Weichteilheilung geht in einem zeitlich regelrechten und dynamisch phasenadaptierten Prozess vonstatten, der im Idealfall in einer annähernd normalen Gewebsstruktur und -funktion resultiert (Stadelmann et al. 1998). Dieser Prozess dauert abhängig von zahlreichen Faktoren normalerweise Tage bis Wochen (Fonder et al. 2008). Bei einem überdurchschnittlich langen Heilungsverlauf würde man von prolongierter Heilung sprechen (Steinberger et al. 2011). Wunden, die den Heilungsprozess entweder nicht regelrecht oder unter zeitlicher Verzögerung durchlaufen und dabei keine adäquate anatomische und funktionelle Integrität (Lazarus et al. 1994) innerhalb von 3 Monaten wiederherstellen können, werden als chronische Wunden bezeichnet (Werdin et al. 2009). In mehr als 90% der Fälle liegt bei einer gestörten Heilung eine systemische Grunderkrankung vor, deren Folge ein Ulcus cruris venosum, ein Dekubitus oder ein diabetischer Fuß sein kann (Eming et al. 2007; Riedel

et al. 2008). Ein wesentlicher Bestandteil aller chronischen Wunden sind lokale hypoxische Gewebeverhältnisse (Mustoe et al. 2006).

2.2.2 Physiologie der Weichteilheilung

Die Heilung zerstörter Gewebestrukturen ist ein komplexer Vorgang, der schon sehr lange Gegenstand intensiver Forschung ist. Definiert ist die Wundheilung als Wiederherstellung der Gewebekontinuität unter Bildung gleichwertiger Gewebestrukturen bzw. Ersatzgewebe (Niethard et al. 2009). Man kann dabei zwischen primärer und sekundärer Wundheilung unterscheiden. Die primäre Wundheilung findet statt, wenn die defekten Strukturen gut adaptierbar und durchblutet sind und nur ein geringer Substanzverlust besteht, der bereits durch eine minimale Gewebsneubildung auszugleichen ist. Eine chirurgische Wunde im Rahmen einer Operation wäre hier als typisches Beispiel zu nennen. Von sekundärer Wundheilung spricht man insbesondere bei größeren Gewebedefekten, bei denen in erheblichem Maße neues Gewebe aufgebaut werden muss. Dabei ist mit einem höheren Risiko an lokalen Komplikationen wie Infektionen oder Störungen der Durchblutung zu rechnen (Niethard et al. 2009). Außerdem heilen diese Wunden unter Ausbildung eines typischen Granulationsgewebes und einer ausgeprägteren Narbenbildung ab (You & Han 2014).

Insgesamt ist die Wundheilung aufgrund des individuellen Gesundheitszustands des Betroffenen und aufgrund der unterschiedlichen Größe und Schwere des Weichteilschadens verbunden mit der daraus resultierenden primären oder sekundären Wundheilung großer zeitlicher Variabilität unterworfen.

Die Wundheilung kann in vier dynamisch ineinander greifende Phasen eingeteilt werden, wobei einige Autoren die ersten beiden Phasen zusammenfassend betrachten. Diese Phasen sind Hämostase, Inflammation, Proliferation und Remodeling, und sollen im Folgenden detailliert erläutert werden (Kujath & Michelsen 2008).

Hämostase

Durch die Exposition von Kollagen während eines Weichteilschadens wird die Gerinnungskaskade aktiviert. Dabei werden Thromboxan A₂ und Prostaglandin 2- α ausgeschüttet, was zur lokalen Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation führt. Daraufhin werden die Thrombozyten durch die Polymerisation von Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin zu einem Gerinnsel verbunden, das vor bakterieller Invasion schützt, die begonnene Blutung stillt und eine erste extrazelluläre Matrix (ECM) als optimale Umgebung für die zelluläre Migration bildet. Außerdem sezernieren die Thrombozyten durch ihre Degranulation zahlreiche Zytokine wie epidermal growth factor (EGF), Histamin, platelet-derived growth factor (PDGF), Serotonin, transforming growth factor (TGF)- β 1 und von-Willebrand-Faktor (vWF) (Falanga 2005; Sinno & Prakash 2013). Dadurch werden insbesondere Makrophagen, Fibroblasten und auch das Komplementsystem aktiviert, wobei insbesondere durch den Komplementfaktor C5 ein chemotaktischer Reiz für neutrophile Granulozyten gesetzt wird (Kujath & Michelsen 2008; Elliott & Hamilton 2011; Sinno & Prakash 2013). Durch die parallele Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer Zellen wird ein dynamischer Übergang in die Entzündungsphase gewährleistet.

Inflammation

Die inflammatorische Phase der Weichteilheilung wird maßgeblich durch den Einfluss der bei der Hämostase sezernierten Faktoren initialisiert. Das aktivierte Komplementsystem, das lokal ausgeschüttete Histamin und die Fibrinspaltprodukte Fibrinopeptid A und B führen zur lokalen Vasodilatation mit konsekutiv erhöhtem Blutfluss und zur Rekrutierung inflammatorischer Zellen wie neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Diese werden im Rahmen der erhöhten vaskulären Permeabilität durch endothelial exprimierte Selektine gebunden und mithilfe von Integrinen in den extrazellulären Raum befördert (Sinno & Prakash 2013). Durch Zytokine und den Komplementfaktor C3 aktiviert, sorgen die neutrophilen Granulozyten für die Lyse von Fremdorganismen bzw. die Eliminierung von pathogenen Mikroorganismen mithilfe von radikalen Sauerstoffspezies (ROS). Der dabei entstandene Zelldebris wird daraufhin von

Makrophagen phagozytiert. Diese Makrophagen sind initial eingewanderte Monozyten, die sich durch Kontakt mit der ECM bzw. durch Einfluss von TGF- β und monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) differenzieren. Sie autolysieren den Gewebe- und Zelldebris mithilfe einer Vielzahl von Enzymen und sezernieren zahlreiche Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), TGF, PDGF, endothelial cell growth factor und verschiedene Interleukine (IL). Durch diese Faktoren werden Fibroblasten und Keratinozyten stimuliert und die Angiogenese induziert (Elliott & Hamilton 2011; Sinno & Prakash 2013; Smith et al. 2014). Damit spielen Makrophagen eine essentielle Rolle beim Übergang in die nächste Phase der Weichteilheilung (Clark 1985).

Proliferation

Durch den Einfluss der während der Inflammation sezernierten Zytokine werden in dieser Phase die Ausbildung eines charakteristischen Granulationsgewebes, die Neoangiogenese und die Epithelisation induziert.

Das Granulationsgewebe, welches erstmals von T. Billroth 1865 definiert wurde (Wild & Auböck (eds.) 2007), erhält seinen Namen durch die rötlichen, körnerartig wirkenden Kapillareinsprossungen innerhalb des neu synthetisierten Gewebes (Martin 1997), mit dem nun der Gewebedefekt aufgefüllt wird. Dabei spielen insbesondere Endothelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und die von ihnen produzierte provisorische ECM eine wichtige Rolle. Dies gilt auch für die damit einhergehende Angiogenese (Singer & Clark 1999). Die Ausbildung neuer Gefäße und deren Anschluss an das bestehende Gefäßsystem sind essentiell für die Nährstoffversorgung sowie den Austausch von Gas und Metaboliten, die insbesondere für die Bildung eines qualitativ guten Granulationsgewebes vonnöten sind.

Die Angiogenese wird bereits kurz nach dem Weichteilschaden induziert, bei dem es durch die lokale Hypoxie zur Sekretion von proangiogenen Faktoren wie vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor 2 (FGF-2) und PDGF kommt, die von Thrombozyten und Makrophagen sezerniert werden (Demidova-Rice et al. 2013). Die Bildung neuer Blutgefäße kann prinzipiell durch zwei unabhängige Vorgänge vonstatten gehen: Erstens durch die Angiogenese, bei der neue Kapillaren durch die Aktivierung, Proliferation und Migration bereits vorhandener Endothelzellen, entstehen,

und zweitens durch die Vaskulogenese, bei der die Blutgefäße in Abhängigkeit endothelialer Vorläuferzellen neu angelegt werden. Bei einem Weichteilschaden und lokaler Hypoxie mit verstärkter Ausschüttung des hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) kommt es konsekutiv zur Ausschüttung weiterer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, VEGF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), FGF-2, placental growth factor, stromal cell derived factor-1 (SDF-1). Dies hat die Induktion von Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) zur Folge, die zur Ausschüttung des stem cell factor (SCF) führt, wodurch endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert werden und dem Gradienten von VEGF und SDF-1 in Richtung des Weichteilschadens folgen (King et al. 2014). Diese Vorläuferzellen sind dazu befähigt, sich u.a. mithilfe von SDF-1 und insulin-like growth factor (IGF) in Endothelzellen zu differenzieren. Die Vorläuferzellen siedeln sich den Endothelzellen nahe des Weichteilschadens an und scheinen große Bedeutung für die regelrechte Weichteilheilung zu haben (Guo & DiPietro 2010; Demidova-Rice et al. 2013). Außerdem werden durch die sezernierten Zytokine die Migration und Proliferation der im Granulationsgewebe befindlichen Endothelzellen angeregt, die darauffolgend neue Zell-Zell Kontakte und neue Blutgefäße bilden (Demidova-Rice et al. 2013).

Die initial synthetisierte provisorische ECM ist nun grundsätzlichen Umbauvorgängen unterworfen, für die vorwiegend Fibroblasten verantwortlich sind (Singer & Clark 1999). Diese Reorganisation der bisher synthetisierten ECM erfolgt vor allem mithilfe von MMP's, die in einem empfindlichen Gleichgewicht mit ihren entsprechenden Gegenspielern, den tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP), stehen (Micallef et al. 2012). Diese Modifikation der Zusammensetzung und der mechanischen Eigenschaften der ECM sowie die Stimulation durch TGF- β 1 führen zu einer Veränderung der phänotypischen Eigenschaften bestimmter Zellen, wodurch auch die Wundkontraktion induziert wird (Hinz 2007).

Sie wird mithilfe eines spezifischen mesenchymalen Zelltyps vollzogen, der aus unterschiedlichen Zellen differenzieren kann. Dieser α -smooth muscle actin (α -SMA) exprimierende Zelltyp differenziert sich aus dem am Wundgrund angesiedelten Fibroblasten, in diesem Fall als Myofibroblast (MF) bezeichnet, aus den dem Knochenmark entstammenden Fibrozyten, die im Blutkreislauf zirkulieren sowie aus Perizyten (Smith et al. 2014). Der α -SMA-positive Zelltyp synthetisiert wichtige ECM-Komponenten und unterstützt mithilfe von zytoskelettalen, kontraktilen Eigenschaften die weiteren Umbauvorgänge (Hinz et al. 2012; Smith et al. 2014). Dabei werden

spezielle Aktin-Myosin-Fibrillen genutzt, die die intrazellulär generierten Zugkräfte mithilfe von Fibronexin auf extrazelluläres Fibronectin übertragen. Zusätzlich können sich diese Zellen in kontraktilen Einheiten zusammenschließen, die durch gap junctions in Verbindung stehen (Tomasek et al. 2002). Insbesondere Perizyten, als einer dieser α -SMA exprimierenden Zelltypen, sind von großer Bedeutung für die Weichteilheilung (Nehls & Drenckhahn 1993).

Die Epithelisation beginnt schon kurz nach Setzen des Weichteilschadens. Epidermale Zellen lösen durch spezifische Änderungen ihres Phänotyps ihre Zell-Zell-Kontakte und bewegen sich mithilfe von Aktin-Filamenten und Integrin-Rezeptoren entlang einer Vielzahl von zuvor synthetisierten ECM-Proteinen wie z.B. Fibronectin, Vitronectin und Kollagen Typ I vom Wundrand ins Zentrum der Wunde. In diesem Zusammenhang wird auch die ECM mithilfe von Kollagenasen und Matrix Metalloproteinase I umgebaut und Integrin-Rezeptoren für die weitere Zellmigration genutzt, wobei durch lokale Zytokine auch die Proliferation der beteiligten Zellen angeregt wird (Singer & Clark 1999).

Remodeling

Diese Phase kann mehrere Monate bis Jahre andauern und stellt den gemeinsamen Abschluss der zuvor initiierten Prozesse dar. Das Remodeling umfasst die abschließende Wundkontraktion, die weitere Reorganisation der bisher synthetisierten ECM sowie die Apoptose von für den weiteren Verlauf der Weichteilheilung nicht mehr benötigten Zellen und Gefäßen (Macri & Clark 2009).

Durch die Apoptose bestimmter Zellen wird die Chronifizierung der inflammatorischen Zellantwort verhindert, die zu einer prolongierten und nicht mehr physiologischen Weichteilheilung führen würde. Ein Beispiel ist der programmierte Zelltod der MF, die zur Initiierung und Aufrechterhaltung immunologischer fibrotischer Prozesse beitragen würden (Peng & Herzog 2012). Durch deren Apoptose wird u.a. die physiologische Narbenbildung ermöglicht. Die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt daher im Verlauf des Wundschlusses stetig an (Desmoulière et al. 1995). Dabei wird die Apoptose durch mehrere Faktoren induziert. Außer dem Entzug lokaler Wachstumsfaktoren ist in diesem Zusammenhang vor allem die Wirkung der MMP's von besonderer Bedeutung. Sie lösen die für die Zellen überlebenswichtigen Integrin-abhängigen Bindungen zur

ECM auf, was den programmierten Zelltod zur Folge haben kann (Darby et al. 2002). Zusätzlich scheint die lokale Erhöhung von Stickstoffmonoxid die Apoptose von Fibroblasten und Endothelzellen zu induzieren (Akasaka et al. 2004). Außerdem kann die Apoptose von Endothelzellen auch durch die im Wundbereich befindlichen MF induziert werden (Rai et al. 2005). Alles in allem führen diese Prozesse innerhalb von Monaten zur Bildung eines deutlich zellärmeren Narbengewebes bestehend aus ECM-Proteinen und Kollagen, wobei durch die verschiedenen MMP's der vorherrschende Kollagen Typ III in den Typ I konvertiert wird. Insgesamt erreichen die neuen Strukturen nicht mehr die Belastbarkeit von unverletztem Gewebe (Gurtner et al. 2008; Sun et al. 2014).

Der Prozess der adulten Weichteilheilung ist ein Reparaturprozess. Hierbei wird die zuvor zerstörte Gewebekontinuität ohne Berücksichtigung der Gewebefunktion, wie dem Ersatz von Haarfollikeln und Schweißdrüsen, wiederhergestellt. Im Gegensatz dazu würde eine Regeneration zum vollständigen Ersatz von Kontinuität und Funktion des geschädigten Gewebes führen, wodurch auch Haarfollikel und Schweißdrüsen ersetzt würden (Martin 1997; You & Han 2014).

2.2.3 Pathophysiologie der Weichteilheilung

Die pathophysiologischen Vorgänge, die letztendlich dazu führen, dass durch Traumata oder Grunderkrankungen entstandene Gewebedefekte innerhalb eines bestimmten Zeitraumes nicht regelrecht abheilen, sind weiterhin nicht vollständig verstanden. Man nimmt an, dass chronische Wunden dadurch entstehen, dass bestimmte Vorgänge auf der Basis lokaler und systemischer Faktoren in bestimmten Phasen der Weichteilheilung nicht regulär stattfinden können. Meist sind durch eine prolongierte Entzündungsphase die physiologischen Vorgänge wie Matrixbildung bzw. Zellproliferation eingeschränkt. Die inflammatorische Phase unterhält sich selbst durch anhaltende Stimulation von Entzündungszellen, konsekutiver Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und Aktivierung von Proteasen, die die ECM so verändern, dass weitere Zellproliferation und Angiogenese unterdrückt werden (Medina et al. 2005; Mutschler 2012).

Weichteilschäden können auch auf dem Boden einer vaskulären bzw. metabolischen Pathophysiologie, wie beim diabetischen Fußsyndrom entstehen (Riedel et al. 2008). Bei diesen Krankheitsbildern ist vor allem die Minderperfusion, die vermehrte Ödembildung sowie die höhere Expression von MMP's und die erniedrigte von TIMP's von zentraler Bedeutung. So beeinflusst, können die beteiligten Zellen ihren Phänotyp und ihre Syntheseigenschaften ändern (Yager & Nwomeh 1999; Bowler 2002; Mutschler 2012).

Auch fehlerhafte Abläufe innerhalb der Angiogenese können zu gestörter Weichteilheilung führen. Dies liegt u.a. an der unterschiedlichen, gewebeabhängigen Reaktion der Endothelzellen auf bestimmte Zytokine. Angiopoetin-1 (Ang-1) beispielsweise stimuliert einerseits die Angiogenese in der Haut, würde sie aber im Herzen supprimieren (Carmeliet 2003). Daher kann ein fehlreguliertes Gefäßwachstum aufgrund gestörter Zytokinausschüttung, welches auch während der Weichteilheilung vorkommen kann, häufiger zu Erkrankungen führen (Carmeliet 2003).

Auch gilt unzureichende Angiogenese als eine der Ursachen von venösen und diabetischen Ulzera, bei denen proangiogene therapeutische Maßnahmen den Heilungsverlauf positiv zu beeinflussen scheinen (Syeda et al. 2012).

Weiterhin kommt es bei nicht regelrechter Angiogenese zu fehlerhafter Narbenbildung (DiPietro 2013). In einem Modell an der Maus zeigte sich, dass therapeutische Inhibition der Angiogenese, z.B. mit VEGF-Rezeptor(R)2-Blockern, zu reduzierter Narbenbildung bei Schnittwunden führt (Ko et al. 2005). Die proangiogenen Zytokine TGF- β und Interleukin-8 (IL-8) sind während der fetalen, narbenlosen Weichteilheilung in geringeren Konzentrationen nachweisbar als in der adulten Weichteilheilung (Greaves et al. 2015).

Insbesondere die TGF- β 1-Ausschüttung korreliert bekanntermaßen mit dem Ausmaß der inflammatorischen Phase der Weichteilheilung und fördert durch Induktion der MF-Differenzierung die Fibrosierung des Gewebes durch Kollagenbildung (Qi et al. 2013).

Dadurch wird deutlich, wie komplex die Prozesse innerhalb der Angiogenese sind, da in bestimmten Fällen und zu bestimmten Zeitpunkten im Heilungsverlauf die Förderung und in anderen die Inhibition der Angiogenese den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können.

2.2.4 Therapeutische Ansätze

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Wundverbände wie transparente Filmverbände, Alginate und Hydrokolloide erfolgreich eingesetzt, nachdem sich gezeigt hat, dass eine Dehydratation die Weichteilheilung eher beeinträchtigt. Eine Kombination aus den verfügbaren therapeutischen Maßnahmen verspricht stets den größten Behandlungserfolg (Rovee 1991; Jones et al. 2006; Tricco et al. 2015). Insbesondere chronische Wunden, die gehäuft bei Patienten mit höherem Alter vorkommen, stellen aufgrund ischämischer Gewebeverhältnisse und bakterieller Kolonisation besondere Anforderungen an die Therapie (Mustoe 2004). Trotz aussichtsreicher Studien mit Zytokinen (Galiano et al. 2004; Boateng et al. 2008) oder intensiver Forschung an möglichen Stammzelltherapien (Andrews et al. 2015) bis hin zum Einsatz von künstlich erzeugten Gewebekomponenten im Rahmen des sog. tissue engineering (Ehrenreich & Ruszczak 2006) sind die meisten der verfügbaren therapeutischen Ansätze häufig nur mit erheblichem finanziellen und personellen Aufwand zu verwirklichen. Zwar erhöhen einige Produkte die Heilungsraten chronischer Wunden um bis zu 25%, aber die ideale Therapie, die zur Reparatur des vormals geschädigten Gewebes führen würde, wird immer noch intensiv gesucht (Clark et al. 2007).

Ein chronischer Weichteilschaden wird ungeachtet der genutzten Therapie nicht regelrecht heilen, solange das Wundmilieu krankhaft verändert ist (Menke et al. 2008).

Daher ist ein umfassenderes Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge und der damit einhergehenden möglichen therapeutischen Angriffspunkte nötig. Insbesondere Substanzen, die die Zell-Zell-Interaktionen und das Wundmilieu beeinflussen, wie VEGF (Romano Di Peppe et al. 2002; Galiano et al. 2004), EPO (Günter et al. 2013; Giri et al. 2015) oder Hämoglobin (Xie et al. 2014) sind für dieses Verständnis sowie als potentielle Therapeutika von enormer Wichtigkeit. Dadurch können schon bestehende Therapiemöglichkeiten optimiert und der Weg für zukünftige therapeutische Ansätze z.B. in Form einer Gen-Therapie bereitet werden (Demidova-Rice et al. 2012).

Zahlreiche Studien belegen zwar die Vorzüge bestimmter Therapieansätze, jedoch werden viele von ihnen nur aufgrund klinischer Erfahrung eingesetzt (Fan et al. 2011). Unabhängig davon, welcher therapeutische Ansatz verfolgt wird, hat sich bei der Behandlung typischer chronischer Weichteilschäden, wie dem diabetischen Fußsyndrom, die Zusammenarbeit in einem multidisziplinären Team bewährt und kann

zu einer krankheitsassoziierten Risikoreduktion des diabetischen Fußsyndroms und der damit einhergehenden Amputationsrate von 50-85% führen (Yazdanpanah et al. 2015). Die Erforschung der pathophysiologischen Zusammenhänge innerhalb der Weichteilheilung ist aus diesen Gründen weiterhin von großer Bedeutung, insbesondere um bessere therapeutische Angriffspunkte herauszustellen.

2.3 Relevanz der Endothelzelle für die Weichteilheilung

Durch die Bildung der innersten Schicht aller Blutgefäße nehmen Endothelzellen außer einer Barrierefunktion auch eine Schlüsselrolle in zahlreichen physiologischen, wie auch pathologischen Prozessen ein, die sich zwischen dem Blutstrom und dem zu versorgenden Gewebe abspielen (Unger et al. 2002; Eckers & Haendeler 2015).

Während allen Phasen der Weichteilheilung sind Endothelzellen nicht nur Angriffspunkt für zahlreiche Zytokine, wie FGF, VEGF, PDGF und TNF- α , sondern sezernieren selbst auch einige wichtige, wie VEGF, IL-8, MCP-1 und GM-CSF (Unger et al. 2002; Velnar et al. 2009). Außerdem bilden sie den vWF (Jaffe et al. 1974) und eine Vielzahl von Rezeptoren aus (Hewett & Murray 1996). Zusätzlich exprimieren sie in Folge bestimmter Stimuli ein charakteristisches Muster von Adhäsionsmolekülen (Pober et al. 2001), wodurch sie die Migration der Leukozyten in das Gewebe regulieren (Cook-Mills & Deem 2005) und maßgeblich an der inflammatorischen Zellantwort während der Weichteilheilung beteiligt sind (Dulmovits & Herman 2012).

Abgesehen davon spielen sie auch die tragende Rolle während der Angiogenese (King et al. 2014), die durch einen Weichteilschaden und daraus resultierende lokale Hypoxie induziert wird (Holderfield & Hughes 2008; Iacobazzi et al. 2015).

Die klinische Relevanz der Endothelzelle für die Pathophysiologie chronischer Weichteilschäden wird deutlich, wenn man betrachtet, dass 90% davon mit Mikrozirkulationsstörungen, lokaler Hypoxie und vermehrtem Wundödem assoziiert sind (Mutschler 2012). Diese pathologischen Prozesse finden ihre Ursache z.T. in einer fehlregulierten Angiogenese, die wiederum durch eine ungünstige Zytokin-Ausschüttung möglicherweise zu abnorm veränderten Kapillaren führt, was sich in der Folge negativ auf die Weichteilheilung auswirken kann (Drinkwater et al. 2003; DiPietro 2013).

2.4 Relevanz des Perizyten für die Weichteilheilung

Als polymorpher und pluripotenter Zelltyp umhüllen Perizyten die Endothelzellen innerhalb derselben Basalmembran und übernehmen hierbei zahlreiche Funktionen. Dabei ist das Verhältnis der beiden Zelltypen zueinander stark gewebeabhängig (Shepro & Morel 1993; Hirschi & D'Amore 1996; Sims 2000). Perizyten regulieren die Differenzierung und Proliferation von Endothelzellen, u.a. auch durch ihre kontraktile Eigenschaften, sowie die Synthese vasoaktiver Substanzen, und bilden darüber hinaus zahlreiche Komponenten der ECM und der Basalmembran (Shepro & Morel 1993). Sie unterstützen Endothelzellen insbesondere während des Ablaufs inflammatorischer Prozesse durch ihre mechanischen und metabolischen Eigenschaften, wodurch sich auch erklären lässt, dass durch negative Einflüsse auf Perizyten zahlreiche vaskuläre Erkrankungen mitverursacht werden (Shepro & Morel 1993; Sims 2000). Perizyten migrieren durch bestimmte pathogene Stimuli, wie Traumata oder Hypoxie, weg von ihrem Ursprungsort. Einer der wichtigsten Aspekte ist die Rolle der Perizyten während der Angiogenese. Dabei nehmen sie Einfluss auf die Initiation, die Formierung, den Weg in das umliegende Gewebe und die Reifung neuer Gefäße. Außerdem beeinflussen sie die Terminierung der Angiogenese (Dore-Duffy 2008). Auf verschiedene angiogene Stimuli, wie ischämisch bedingte Hypoxie, migriert der Perizyt an einen extravaskulären Ort und ermöglicht so die Entstehung neuer Gefäße. Dies geschieht durch Signalkaskaden im Zusammenhang mit der Ausschüttung von Prostaglandin J_2 sowie zahlreichen Enzymen wie Urokinase, Aminopeptidasen und Metalloproteinasen. Allerdings migriert der Perizyt auch an einen extravaskulären Ort, um dem Einfluss, in Folge der Hypoxie entstandener, toxischer Metabolite wie Laktat zu entgehen, was durch Wegfall seiner stützenden Funktionen aber auch zu einer erhöhten Fragilität und Permeabilität schon vorhandener Gefäße führen kann (Dore-Duffy et al. 2000; Dore-Duffy & La Manna 2007).

Die diabetische Retinopathie (Guillemin & Brew 2004) sowie die Bildung krankhafter Mikroaneurysmen sind typische Krankheitsbilder, die aus nicht physiologischem Perizytenverlust resultieren (Ozderdem & Stallcup 2004; Das et al. 2015). Der Einfluss der Perizyten auf Endothelzellen zeigt sich beispielsweise auch deutlich während früher Phasen der Angiogenese. Hier exprimieren die Perizyten das Proteoglykan NG2, das durch Bindung an basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived growth factor AA (PDGF-AA) sowie Plasminogen die Zellmotilität beeinflusst. Bei experimenteller

Inhibition des von Perizyten exprimierten NG2 kommt es nicht nur zu deutlich reduzierten Proliferationsraten von Perizyten, sondern auch von Endothelzellen (Ozerdem & Stallcup 2004).

Perizyten gelten unabhängig von der Angiogenese als einer der wesentlichen Ausgangspunkte für die adulte Weichteilheilung (Kadoya et al. 2008; Paquet-Fifield et al. 2009). Zusätzlich zur Ausbildung eines α -SMA-positiven Zelltyps sind sie in ihrer Eigenschaft als pluripotenter Zelltyp fähig, sich zu mehreren weiteren, wie beispielsweise einem Makrophagen-ähnlichen, antigenpräsentierenden Zelltyp, zu differenzieren (Dore-Duffy 2008).

Insbesondere für die Weichteilheilung erlangen Perizyten immer mehr an Bedeutung, da sich immer mehr herauskristallisiert, dass sie ein bisher ungeahntes Potenzial besitzen, die funktionellen und strukturellen Reparaturvorgänge verschiedenster Gewebe zu unterstützen (Park et al. 2011; Chen et al. 2013; Dulmovits & Herman 2012).

2.5 Erythropoietin in der Weichteilheilung

Erythropoietin (EPO) ist ein 30400 Dalton (Da) schweres Glykoproteinhormon, bestehend aus 165 Aminosäuren, und stellt den wichtigsten Regulator der Erythropoese dar. In Folge hypoxischer Gewebeverhältnisse kommt es durch den Transkriptionsfaktor HIF zur Aktivierung seines Gens auf Chromosom 7 in den peritubulären Zellen der adulten Nieren (Fisher 2003; Foley 2008). EPO vermittelt seine Effekte durch Interaktion mit einem Typ-I-Zytokinrezeptor (EPO-R), der sich sowohl auf der Zelloberfläche von erythroiden Vorläuferzellen, als auch auf zahlreichen nicht hämatopoetischen Zelltypen befindet (Haroon et al. 2003). Dabei ist insbesondere die Wirkung von EPO auf Endothelzellen und die Angiogenese interessant (Ribatti et al. 1999). EPO fördert die Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen und inhibiert ihre Apoptose, insbesondere bei der Bildung des Granulationsgewebes während der Weichteilheilung (Sayan et al. 2006). Effekte, wie verminderte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Regulation der Kollagensynthese sowie gesteigerte Reepithelisierungsrate, können auch indirekt durch die vermehrte Synthese von VEGF vermittelt werden (Sayan et al. 2006). Es zeigte sich weiterhin, dass bestimmte Zellen in Hautanhangsgebilden nicht nur den EPO-R exprimieren, sondern nach bestimmten Stimuli sogar EPO produzieren, um den protektiven Einfluss für sich zu nutzen (Bodó et al. 2007). Beispielsweise durch seine Wirkung auf Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten schwächt EPO die Inflammation ab, fördert die Angiogenese und verbessert das Remodeling verschiedener Matrix-Komponenten. EPO nimmt daher positiven Einfluss sowohl auf die physiologische, als auch auf die pathologische Weichteilheilung, wie sie z.B. bei Diabetes Mellitus oder Verbrennungen auftritt. Insbesondere bei Letzteren hat sich die modulierende Wirkung von EPO auf Regulatoren des Zellzyklus der geschädigten Zellen als vielversprechend erwiesen (Irrera et al. 2015).

2.6 Experimentelle Modelle zur Weichteilheilung

Die Heilung eines Weichteilschadens ist ein multifaktoriell beeinflusster, komplexer Prozess, der hohe Anforderungen an seine Untersuchungsmodelle stellt. Man kann In-vivo-, Ex-vivo- und In-vitro-Modelle zur Untersuchung der Weichteilheilung unterscheiden. In-vivo-Modelle stellen zwar die natürlichen Wundverhältnisse gut dar, sind aber in der Auswertung ihrer Einzelkomponenten schwierig und im Falle von Tiermodellen oft nur unzureichend mit den Verhältnissen am Menschen zu vergleichen; hinzu kommt die Problematik aus ethischen Gesichtspunkten (Gottrup et al. 2000; Gordillo et al. 2013).

Ex-vivo-Modelle verwenden z.B. humane Hautproben direkt nach Exzision (Larregina et al. 2001), wobei die physiologischen Bedingungen der menschlichen Haut während der Versuchsdurchführung annähernd bestehen bleiben sollen. Allerdings ist es schwierig, diese Physiologie unter Kulturbedingungen so aufrecht zu erhalten, dass eine adäquate und reproduzierbare Versuchsdurchführung gewährleistet ist (Xu et al. 2012).

In-vitro-Modelle sind ethisch unproblematisch und ermöglichen es, verschiedene Faktoren oder Wirkstoffe innerhalb eines Standardmodells vergleichbar zu untersuchen. Allerdings bilden sie letztendlich nur die Grundlage für einen weiterführenden Ansatz in einem komplexen Organismus (Gottrup et al. 2000; Kirkpatrick et al. 2002). Da In-vitro-Modelle bestens dafür geeignet sind, die dosisabhängige Zellinteraktion für verschiedene Substrate sowie den Wundschluss zu untersuchen (Calderon et al. 1996; Steinstraesser et al. 2010; Loo & Halliwell 2012), basiert die vorliegende Arbeit auf einem In-vitro-Co-Kultur-Modell (Oberringer et al. 2007). Es vereint die Vorteile eines Co-Kultur-Modells aus Endothelzellen und Fibroblasten mit denen eines In-vitro-Wundheilungsassays und erlaubt es daher, verschiedene zelluläre Parameter standardisiert zu untersuchen. In vorangegangenen Studien wurde mit Hilfe dieses Modells der Einfluss potentieller Therapeutika der Weichteilheilung an verschiedenen Zelltypen untersucht (Oberringer et al. 2008; Breit et al. 2011; Schwarz et al. 2013; Aichele et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HDMEC) und humane Perizyten (HPC) mono- und co-kultiviert und nach normoxischen und hypoxischen Bedingungen analysiert. Im Weiteren wurde der Effekt einer EPO-Supplementierung in Bezug auf die Proliferation, Migration, Apoptose und Differenzierung sowie auf die Ausschüttung von MCP-1 und VEGF untersucht.

2.7 Fragestellung

- Ist eine direkte Co-Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen und humanen Perizyten möglich?
- Weisen Zellen in Co-Kultur charakteristische Unterschiede zu Zellen in Mono-Kultur auf?
- Inwieweit sprechen die erhobenen Daten für eine grundsätzliche Eignung des Modells zur Analyse der hier verwendeten Parameter?
- Kann die Zellantwort auf Hypoxie im Modell quantifiziert werden?
- Ist der Einfluss von Erythropoietin in diesem In-vitro-Modell nachweisbar?
- Inwieweit sind die in vitro gewonnenen Ergebnisse auf die Weichteilsituation in vivo übertragbar?

3. Material und Methodik

3.1 Überblick

Die Versuche wurden mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) aus der Dermis männlichen, juvenilen Präputiums sowie Perizyten (HPC) aus der humanen Plazenta der Firma Promocell durchgeführt. Die Zellen wurden aus zuvor angelegten „Master Cell Banks“ (MCB) ab Passage (P)6 (HDMEC) bzw. P4 (HPC) für 7 Tage expandiert und schließlich auf Objektträgern jeweils als Mono- und Co-Kulturen ausgesät. Die verschiedenen Zellpräparate wurden nach „Scratching“ des Wundspaltes unterschiedlichen Versuchsbedingungen ausgesetzt, nach Abpipettieren des Mediumüberstandes zu den jeweiligen Zeitpunkten fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Die Datenakquise erfolgte mittels mikroskopischer Quantifizierung sowie Analytik des Mediumüberstandes per ELISA, woraufhin sich die statistische Auswertung anschloss. Die einzelnen Versuchsbedingungen und Techniken werden im Folgenden detailliert beschrieben.

3.2 Zellkultivierung

Prinzipiell wurden die Arbeiten an Zellkulturen unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Kultivierung erfolgte innerhalb eines Inkubators unter Standardbedingungen (37°C; 5 % CO₂/Luft; 95 % Luftfeuchtigkeit).

3.2.1 Kultivierung humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Tabelle 1: Standardisierter zeitlicher Ablauf der Kultivierung von HDMEC

Tag	HDMEC
0	Ansetzen einer Kryokultur in zwei T25-Kulturflaschen (P6)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung in zwei T75-Kulturflaschen (P7)
4	Mediumwechsel
7	Unterkultivierung: Ansetzen der Mono-/Co-Kulturen
8	Versuchsdurchführung

Als erster Schritt der Zellexpansion erfolgte die Aussaat von HDMEC aus einer Kryokultur der Passage 6, aus einer zuvor angelegten MCB mit identischen Kulturen. Hierzu wurden die Zellen zunächst im 37° C warmen Wasserbad aufgetaut und anschließend unter sterilen Bedingungen mittels einer Einmal-Pasteurpipette in eine T25-Kulturflasche überführt. Anschließend wurden zu 1 ml Zell-Suspension 5 ml Endothelzell-Wachstumsmedium (ECG-MV) zugegeben und resuspendiert. 3 ml dieser Zellsuspension wurden in eine zweite T25-Kulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag sowie an Tagen nach der Unterkultivierung erfolgte ein Mediumwechsel mit 5 ml bzw. 10 ml ECG-MV bei T25- bzw. T75-Kulturflaschen.

Die Unterkultivierung von P6 auf P7 erfolgte am dritten Tag nach dem Ansetzen der Kryokultur von jeweils einer T25-Kulturflasche in eine T75-Kulturflasche.

Hierbei wurde zunächst phasenkontrastmikroskopisch die Konfluenz beurteilt. Bei einer Konfluenz von über 80 % wurde das Medium dekantiert und die Zellen anschließend zweimalig mit 5 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gespült. Nun erfolgte das Ablösen der Zellen durch Zugabe von jeweils 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung pro T25-Kulturflasche und anschließender Inkubation für 2 Minuten und 15 Sekunden im Brutschrank. Nach Ablauf der Zeit wurde das Abkugeln der Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert und die Zellen dann durch Beklopfen der Kulturflaschen abgelöst. Die enzymatische Wirkung der Trypsin-EDTA-Lösung wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an ECG-MV neutralisiert und die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation (3 min; RT; 1000 U/min) wurde

der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend in einer T75-Kulturflasche angesetzt.

Bei jeder Unterkultivierung wurde mithilfe des CASY die Anzahl der vitalen Zellen ermittelt. Alle beschriebenen Medienwechsel und Unterkultivierungen erfolgten nach den gleichen Prinzipien.

Der zeitliche Ablauf der HDMEC Kultivierung ist in Tab. 1 ersichtlich.

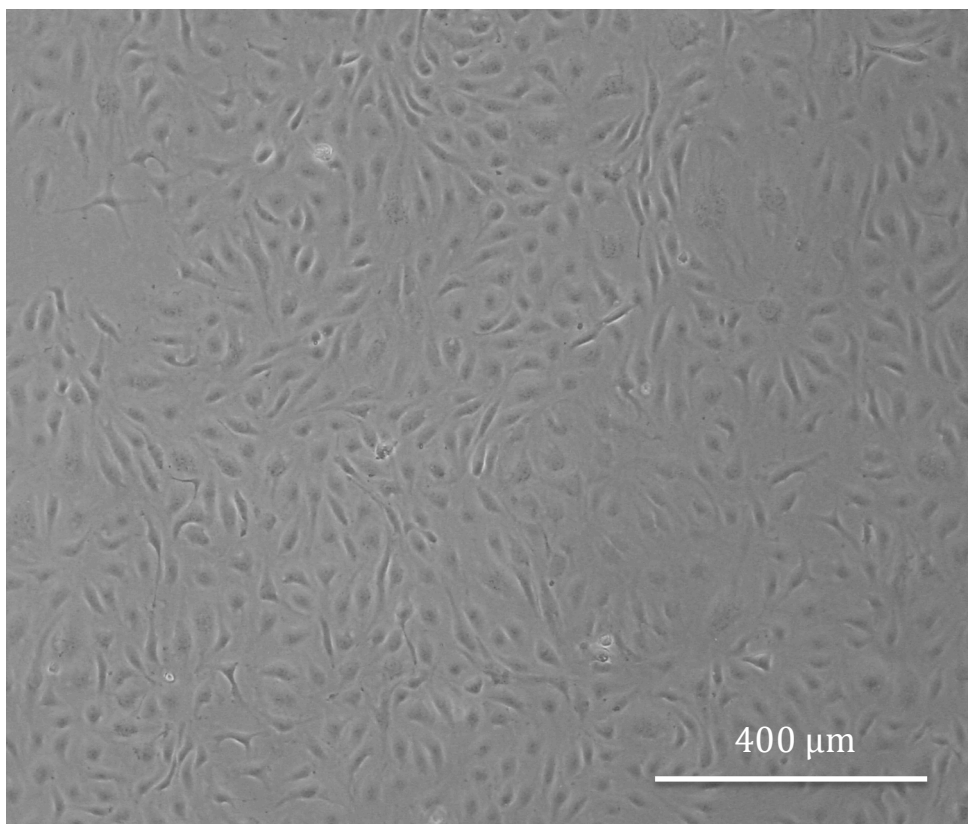


Abbildung 1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer sub-konfluenten HDMEC-Kultur an Tag 7

3.2.2 Kultivierung humaner Perizyten

Tabelle 2: Zeitlicher Ablauf der Kultivierung von HPC

Tag	HPC
0	Ansetzen einer Kryokultur in zwei T25-Kulturflaschen (P4)
1	Mediumwechsel
3	Unterkultivierung in zwei T75-Kulturflaschen (P5)
4	Mediumwechsel
7	Unterkultivierung: Ansetzen der Mono-/Co-Kulturen
8	Versuchsdurchführung

Als erster Schritt der Zellexpansion erfolgte das Ansetzen der HPC aus einer Kryokultur der Passage 4 aus einer zuvor angelegten MCB (Tab. 2). Die Zellexpansion erfolgte nach den gleichen Prinzipien wie für HDMEC beschrieben (siehe 3.2.1). Lediglich wurde bei der Arbeit mit HPC ein Perizytenzell-Wachstumsmedium (PCGM) verwendet. Abweichend vom Protokoll der Unterkultivierung von HDMEC wurden HPC unmittelbar nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung und ohne Inkubation im Brutschrank auf das Abkugeln der Zellen hin mikroskopiert.

Der zeitliche Ablauf der Kultivierung der HPC ist identisch mit dem der HDMEC, sodass am 7. Tag eine Unterkultivierung zum Ansetzen der Mono- und Co-Kulturen erfolgen konnte.

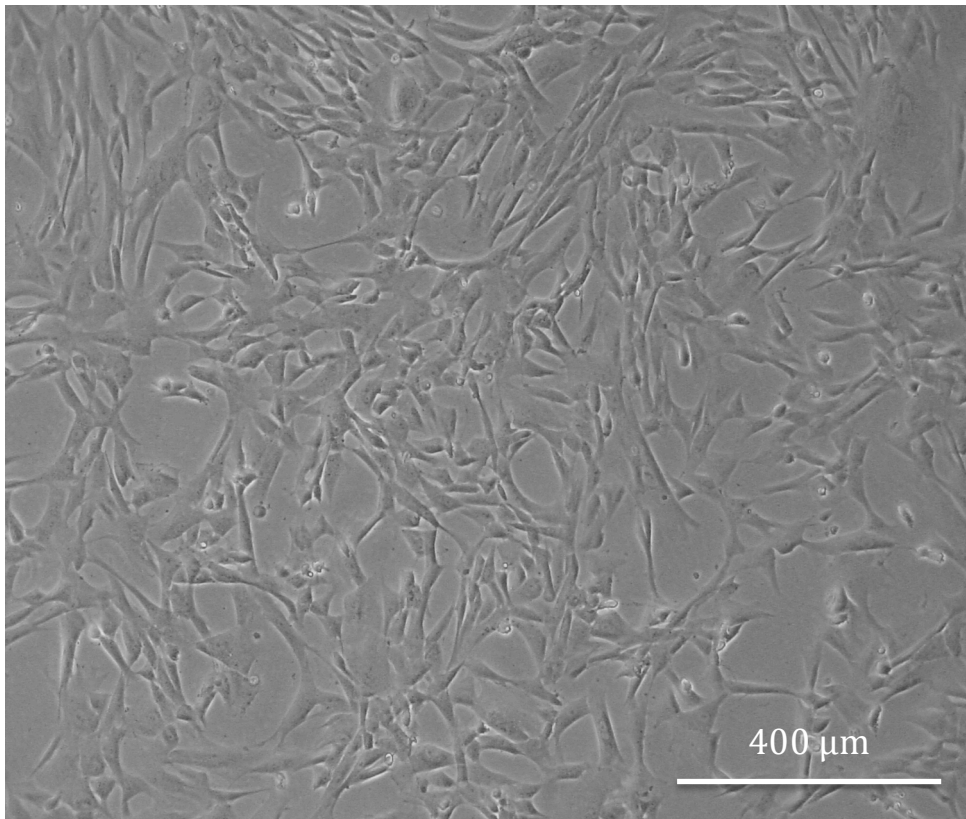


Abbildung 2: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme einer sub-konfluenten HPC-Kultur an Tag 7

3.2.3 Co-Kultivierung beider Zelltypen

An Tag 7 der Zellexpansion erfolgte die Herstellung der Objektträger-Kulturen 24 h vor Start der Experimente. Es wurden HDMEC- und HPC-Mono- und Co-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden die T75-Kulturflaschen zweimal mit jeweils 10 ml PBS gespült und mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert. Nach Ablösen der Zellen wie zuvor beschrieben wurden die Zellen in einem Co-Kultur-Medium, das aus gleichen Teilen ECG-MV und PCGM bestand, resuspendiert und die Zellzahlen mittels CASY bestimmt. Die Zellen wurden in einer angestrebten Zelldichte von 170 Zellen/mm² (HDMEC) und 80 Zellen/mm² (HPC) in den Mono-Kulturen und 250 Zellen/mm² (170 HDMEC/mm² plus 80 HPC/mm²) in den Co-Kulturen auf vorbereitete Objektträger (OT) in jeweils 5 ml des Co-Kultur-Mediums ausgesät. Diese Zelldichten wurden in einer Reihe von Vorversuchen ermittelt, um die adäquate Auswertung der Versuchsparameter, speziell des Spaltschlusses, über den gesamten Versuchsablauf zu gewährleisten.

Vor der Verwendung der OT als Zellkulturoberfläche wurden diese einer Reinigungsprozedur unterzogen: Es wurden jeweils 18 OT in eine Glasschaukel eingesetzt und insgesamt 5 von diesen Glasschaukeln in ein Becherglas mit 2 l Volumen gestellt. Das Becherglas wurde nun mit Leitungswasser und einem konventionellen Geschirrspülmittel befüllt. Am nächsten Tag erfolgte eine zweistündige Wässerung unter fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Objektträgerschaukeln für 1 h in einer 1 %-igen HCl-Lösung belassen. Es folgte eine weitere Wässerung unter fließendem Leitungswasser für 1 h. Hiernach wurden die OT für 1 h mit einer 1 %-igen NaOH-Lösung versetzt. Daraufhin wurden die OT für weitere 2 h unter fließendem Leitungswasser gewässert. Nun wurden die OT zuerst mit destilliertem Wasser und anschließend mit 96 %-igem Ethanol gespült. Im Anschluss wurden die OT im Trockenschrank getrocknet. Die OT in Glasschaukeln wurden in Alufolie verpackt und 2 h bei 200° C sterilisiert.

Für den Versuch wurden die verschiedenen Kulturen auf OT in QuadriPERM-Schalen angesetzt. Zuvor wurden die vorbereiteten OT unter der Sicherheitswerkbank steril in die QuadriPERM-Schalen eingesetzt. Dabei wurde mithilfe eines Diamantenschreibers auf der Rückseite der OT markiert, an welcher Lokalisation auf der Vorderseite die späteren In-vitro-Wunden zu setzen sind.

3.3 Generelles experimentelles Setup/Co-Kultur-Assay

Tabelle 3: Präparate der Mono-/Co-Kulturen und Fixierungszeitpunkte eines Versuches

Zeit	0 h	18 h	42 h
Präparate	Normoxie (0 h N)	Normoxie (18 h N)	Normoxie (42 h N)
		Normoxie mit EPO (18 h N/E)	Normoxie mit EPO (42 h N/E)
		Hypoxie (18 h H)	
		Hypoxie mit EPO (18 h H/E)	

Die einzelnen Versuche bestanden jeweils aus 7 Objektträgern, auf denen die Kulturen ausgesät wurden (je n=6 für HPC- und HDMEC-Mono-Kultur und n=6 für die Co-Kultur). 24 h nach Ansetzen (siehe 3.2.3) wurden bei allen 7 Proben durch manuelles „Scratchen“ des Zelllayers mittels einer Pipettenspitze zwei In-vitro-Wundspalte auf Höhe der markierten Stellen induziert (siehe Abb. 3, 4). Zu diesem Zeitpunkt wurde allen Präparaten die definitive Bezeichnung zugeordnet. Ein Präparat, als 0h Normoxie (0 h N) bezeichnet, wurde unmittelbar danach fixiert. Dieses Präparat wurde später zur Bestimmung der Ausgangswerte verwendet. Bei allen anderen Präparaten wurde ein Mediumwechsel mit jeweils 5 ml Co-Kulturmedium vollzogen, mit oder ohne EPO-Supplementierung (ERYPO® FS 1000 I.E./0.5 ml, Janssen-Cilag, Neuss, Germany). Zwei Präparate wurden unter normoxischen, d.h. Standardbedingungen (37° C; 5 % CO₂/Luft; 95 % Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank weitere 18 h inkubiert (18 h N), wovon eines zusätzlich mit EPO versetzt wurde (18 h N/E). In diesem Zusammenhang wurden Vorversuche mit einer EPO-Konzentration von 5, 25 und 50 IU/ml in Co-Kultur-Medium durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, dass eine EPO-Konzentration von 50 IU/ml nicht zu toxischen Nebeneffekten führte, sodass diese EPO-Konzentration für alle weiteren Versuche verwendet wurde. Gleichzeitig wurden zwei weitere Präparate 18 h unter hypoxischen Bedingungen (18 h H), d.h. innerhalb der Hypoxiekammer bei 37° C, inkubiert (siehe 3.4), wobei wiederum eines dieser beiden Präparate mit EPO versetzt wurde (18 h H/E). Zwei weitere Präparate wurden weitere 24 h unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Daher ergibt sich für diese zwei Präparate insgesamt eine Inkubationszeit von 42 h unter normoxischen Bedingungen (42 h N; 42 h N/E). Eine Übersicht der Präparate ist in Tab. 3 ersichtlich.

Unmittelbar vor Fixierung der Präparate wurde von jedem Präparat 2 x 1 ml Medium entnommen, welches bei -80 ° C gelagert wurde, um später die MCP-1- und die VEGF-

Menge mittels enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) zu quantifizieren (siehe 3.7.2; 3.7.3). Nach Entnahme der Mediumproben wurde der restliche Mediumüberstand abpipettiert und verworfen. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit jeweils 5 ml PBS. Nach Entfernung der PBS wurden die Präparate mit 0,05 mol/l vorgewärmtem Kaliumchlorid (KCl) für 5 min bei 37° C inkubiert (Hypotonie-Schritt). Danach wurden die Präparate mit -20° C gekühltem Methanol innerhalb von 10 min fixiert. Nachdem sie bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden sie mit einem Gemisch aus PBS/Glycerin (1:10) eingedeckt und anschließend bei -20° C gelagert.

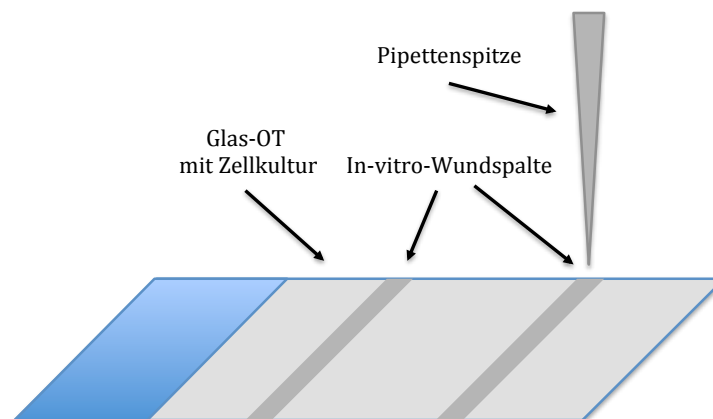


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Objektträgers mit jeweils zwei In-vitro-Wundspalte

Co-Kultur-Assay

Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurden auf jedem der Objektträger einer Kultur zwei Färbereiche festgelegt, in denen für die spätere Auswertung unterschiedliche Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden. In jedem dieser zwei Färbereiche wurde der jeweilige In-vitro-Wundspalt mit einer 1000 µl-Pipettenspitze in den Zell-Monolayer „gescratcht“ (siehe Abb. 4).

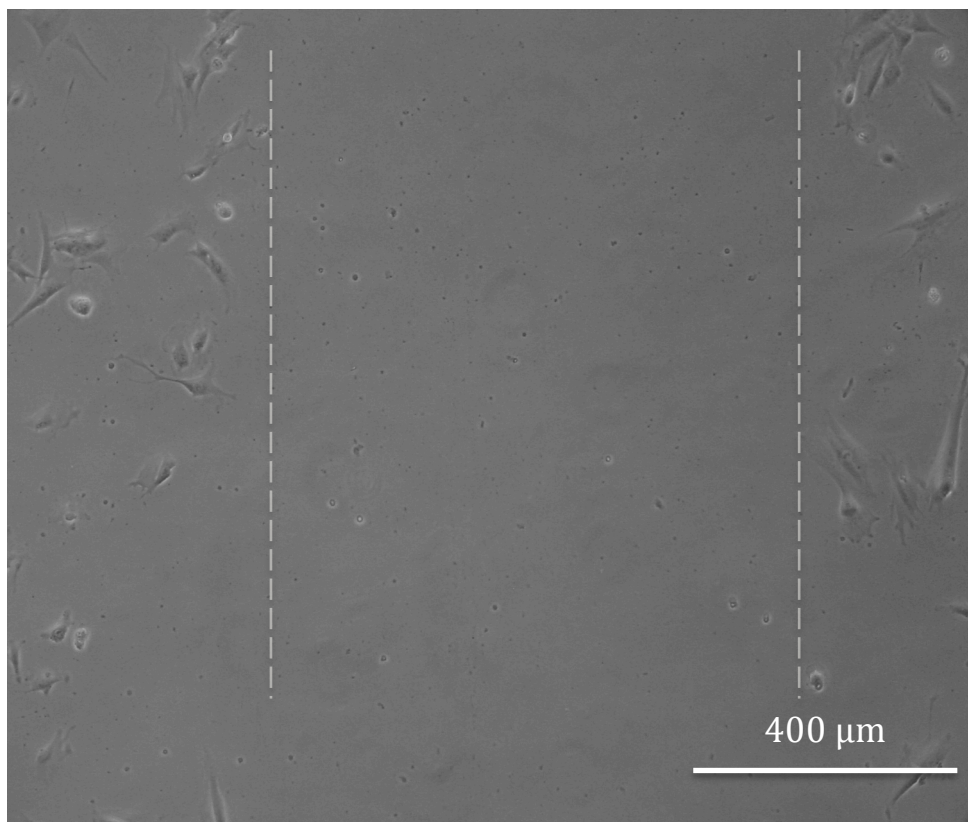


Abbildung 4: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme eines In-vitro-Wundspalts einer Co-Kultur aus HDMEC und HPC initial nach Versuchsbeginn (0 h N)

3.4 Hypoxie

Zur Gewährleistung hypoxischer Kultivierungsbedingungen unter gleichzeitiger Pufferung des pH-Wertes des Mediums wurde eine Hypoxiekammer genutzt. Diese durch Einstellen eines Wasserreservoirs befeuchtete Kunststoffkammer befand sich innerhalb eines Brutschrankes bei 37° C. Während des Versuchs wurde sie mit einem Gasgemisch aus 95 % N₂ und 5 % CO₂ bei konstantem Gasfluss von 1 l/min perfundiert, sodass sich ab einer Zeit von 90 min ein Sauerstoffpartialdruck (pO_2) von unter 5 mmHg im Kulturmedium einstellte, der über die gesamte Inkubationszeit von 18 h erhalten blieb (Schmitz et al. 2011; siehe Abb. 5). Zur Überprüfung des pO_2 wurde eine Lycox-Sonde und das zugehörige Monitoring-System verwendet.



Abbildung 5: **1:** Hypoxiekammer; **2:** Brutschrank

3.5 Immunfluoreszenzfärbung

3.5.1 Prinzip

Durch eine Immunfärbung können bestimmte Zell- oder Gewebestrukturen mithilfe von Antikörpern visualisiert werden. Die gesuchten Strukturen können sich prinzipiell in jedem Kompartiment der Zelle befinden. Im vorliegenden Modell diente die Immunfluoreszenzfärbung u.a. dazu, die verschiedenen Zellpopulationen innerhalb der Co-Kulturen zu identifizieren und zu charakterisieren. Prinzipiell bindet ein spezifischer Primärantikörper an das Epitop des gesuchten Antigens. Nach Inkubation und Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe werden alle ungebundenen Primärantikörper ausgewaschen und es erfolgt die Inkubation mit einem Sekundärantikörper. Dieser Sekundärantikörper ist entweder mit einer enzymatischen oder fluoreszierenden Eigenschaft ausgestattet. Prinzipiell können mehrere Antikörper verwendet und simultan mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops sichtbar gemacht werden.

3.5.2 Antikörper

Von-Willebrand-Faktor

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) ist ein komplexes, multimeres Glykoprotein, welches in Endothelzellen und Megakaryozyten produziert wird (Wagner & Marder 1984). Er kommt im Blutplasma und der subendothelialen ECM vor, wird von Megakaryozyten und Thrombozyten in α -Granula und von Endothelzellen in sog. Weibel-Palade bodies (WPB) intrazellulär gespeichert (Lenting et al. 2015). Die WPB werden bei Stimulation der Endothelzellen, z.B. durch einen vaskulären Schaden, aktiv sezerniert (Romani de Wit et al. 2003). Der darin enthaltene vWF vermittelt insbesondere die Thrombozytenadhäsion und -aggregation während der Hämostase und spielt eine besondere Rolle als molekularer Carrier für den Gerinnungsfaktor VIII (Xie et al. 2000). In Folge von Mutationen kann es zu einer verminderten Synthese bzw. verstärktem Abbau von vWF kommen, was zu schwerwiegenden Blutungskomplikationen führen kann und in diesem Zusammenhang als von-Willebrand-Krankheit bezeichnet wird (Sadler 2009).

Der anti-humane vWF-Antikörper ist einer der gängigsten Marker für Endothelzellen (Cines et al. 1998; Pusztaszeri et al. 2006), mit dem in unserem Modell Endothelzellen von Perizyten quantitativ unterschieden werden konnten. Um diesen vom Kaninchen stammenden Primärantikörper gegen vWF (rabbit polyclonal anti-von Willebrand factor Ab-1, 1:500 in PBS/bovine serum albumin 0,1 %) zu detektieren, verwendeten wir den rot fluoreszierenden Sekundärantikörper goat anti-rabbit (GAR)-Cy3™ (Cy3™-conjugated goat anti-rabbit, 1:200 in PBS/bovine serum albumin 0,1 %; siehe Abb. 6).

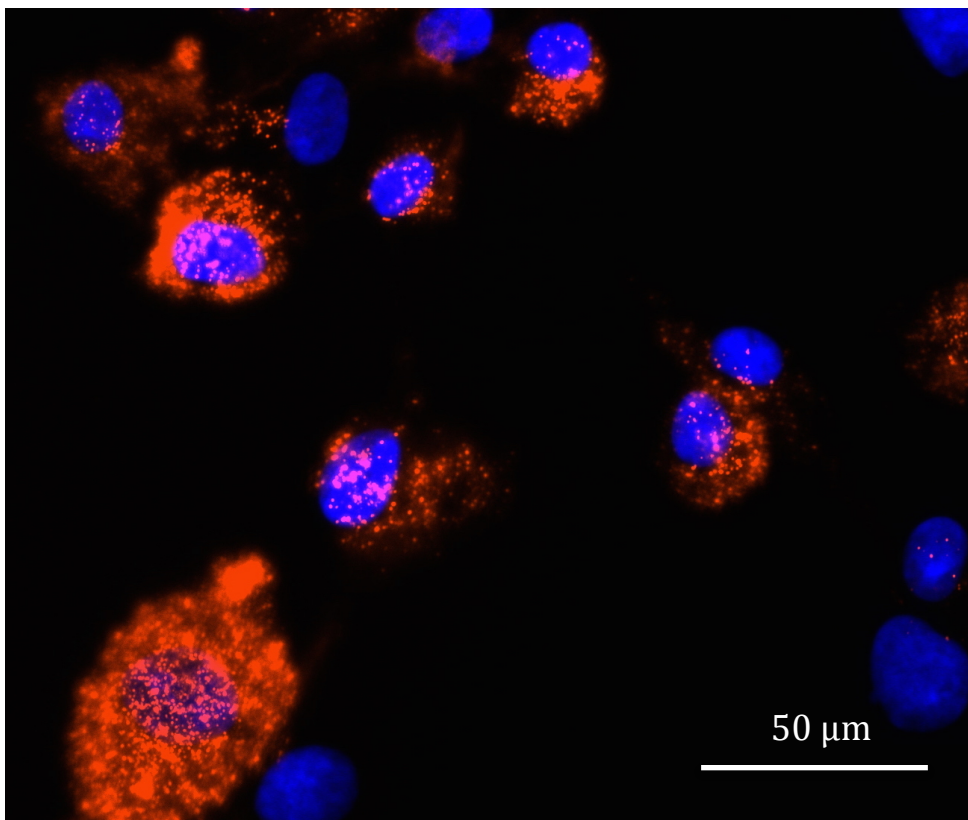


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einiger HDMEC innerhalb einer Co-Kultur nach Färbung mit einem rabbit anti-human vWF-Antikörper detektiert mit einem goat anti-rabbit-Cy3™-Antikörper (rot); die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

α -Smooth-Muscle-Actin

Für die meisten eukaryotischen Zellen ist Aktin ein essentieller Bestandteil, speziell im Hinblick auf mechanische Stabilität und Motilität (Pollard & Cooper 2009). Dabei existieren mehrere Isoformen des Aktins simultan in unterschiedlichen Geweben, wobei das α -SMA die vorherrschende Isoform in der glatten Muskulatur von Gefäßen darstellt (Vandekerckhove & Weber 1978; Fatigati & Murphy 1984). Zu den Zelltypen, in denen α -SMA exprimiert werden kann, gehören u.a. auch MF und Perizyten, sodass sie mithilfe des anti- α -SMA-Antikörpers identifiziert werden können (Skalli et al. 1989; Arnoldi et al. 2013). Der von uns verwendete mouse anti-human α -SMA-Antikörper (α -SMA, mouse monoclonal anti- α -SMA, 1:800 in PBS/bovine serum albumin 0,1 %) konnte mithilfe des grün fluoreszierenden goat anti-mouse (GAM)-Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Antikörpers (FITC, goat anti-mouse, 1:100 in PBS/bovine serum albumin 0,1 %) detektiert werden (siehe Abb. 7).

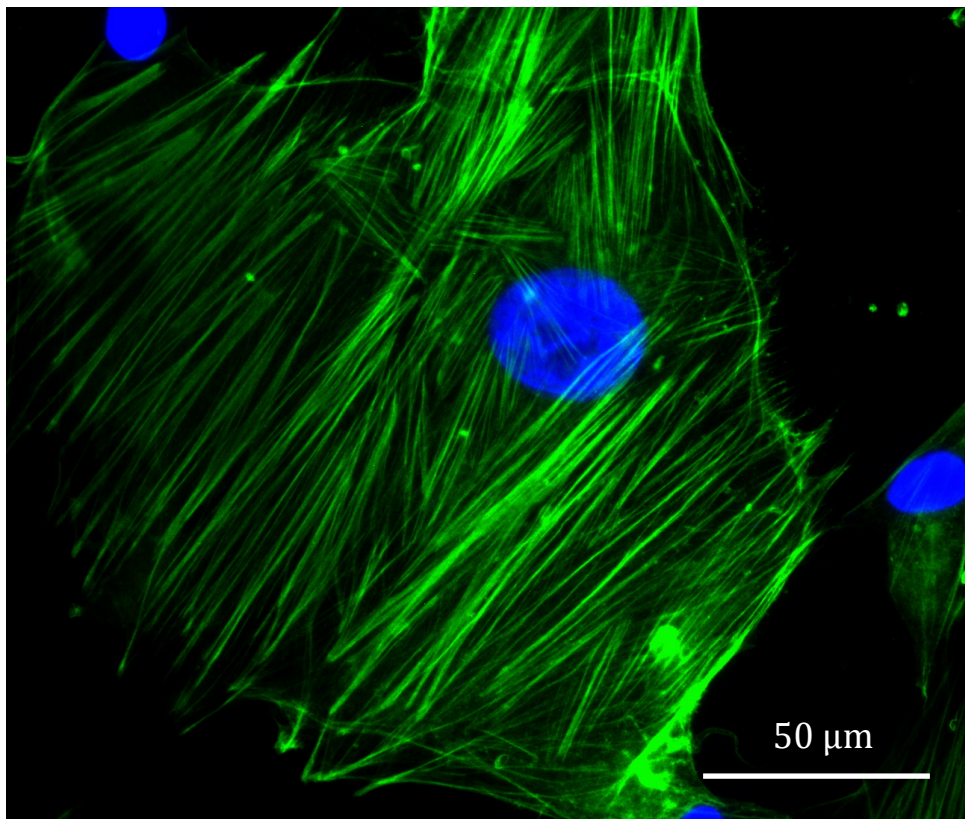


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einiger α -SMA-positiver HPC nach Färbung mit einem mouse anti-human α -SMA-Antikörper detektiert mit einem goat anti-mouse-FITC-Antikörper (grün); die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

Ki-67/MIB-1

Das Ki-67-Antigen ist ein nukleäres, DNA-bindendes Protein, das als verlässlicher Proliferationsmarker vor allem in der Zell- und Tumorbilogie einen hohen Stellenwert hat (Chen et al. 2015). Dieses Antigen präsentiert sich in den Zellzyklusphasen G₁, S, G₂ und während der Mitose und ist bei ruhenden Zellen in der G₀-Phase nicht nachweisbar. Daher kann es genutzt werden, um den proliferierenden Anteil einer Zellpopulation zu quantifizieren (Gerdes et al. 1983; Scholzen & Gerdes 2000). Es sind mehrere Antikörper gegen das Ki-67-Antigen bekannt, jedoch hat sich der monoklonale mouse anti-human Antikörper MIB-1 (Ki-67/MIB-1, 1:100 in PBS/bovine serum albumin 0,1 %) im Hinblick auf die Immunhisto- und zytochemie als vorteilhaft erwiesen (Cattoretti et al. 1992; Rose et al. 1994; Lindboe & Torp 2002). Dieser kann ebenfalls mit dem grün fluoreszierenden Sekundärantikörper GAM-FITC detektiert werden (siehe Abb. 8).

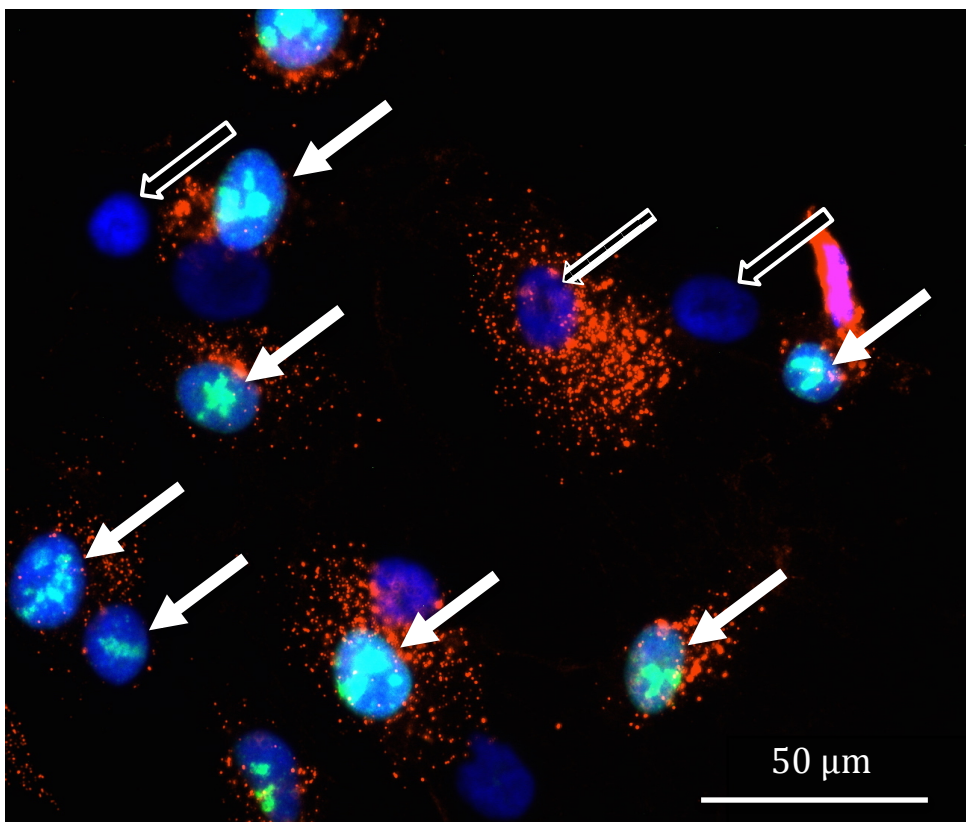


Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Ki-67-positiven HDMEC innerhalb einer Co-Kultur (vWF, rot) nach Färbung mit einem mouse anti-human Ki-67/MIB-1-Antikörper und sekundärer goat anti-mouse-FITC (grün) Färbung (weiße Pfeile) sowie Ki-67-negative HDMEC (schraffierter Pfeil) und HPC (schwarze Pfeile). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

3.5.3 Durchführung

Die Immunfluoreszenzfärbung aller 7 OT eines Versuchs wurde in Sandwich-Technik und für Mono- und Co-Kultur auf die gleiche Art und Weise durchgeführt.

Dafür wurden zuerst die bei -20°C gelagerten Präparate bei RT aufgetaut und die Deckgläser entfernt. Es folgten Waschschrte innerhalb einer Färbeküvette, bei denen die Präparate 3 x 5 min mit PBS/0,5 % Tween 20 (PBS-T) gewaschen wurden. Dieser Vorgang schloss sich nach jeder Inkubation mit Antikörpern an. PBS dient dazu, eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern und ermöglicht, die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper von den Präparaten zu entfernen. Der zu verwendende Antikörper wurde nach Verdünnungsvorgabe mit einem Gemisch aus PBS und 0,1 % bovinem Serumalbumin (BSA) verdünnt und 70 μl davon auf jeweils ein großes Deckglas pro OT pipettiert. Große Deckgläser wurde jeweils verwendet, um den gesamten OT zu inkubieren.

Bei Verwendung von zwei Färbefeldern auf einem OT wurden zwei kleine Deckgläser nebeneinander mit jeweils 20 μl des verwendeten Antikörpers vorbereitet (siehe Abb. 9). Die Antikörperverdünnung und die Vorbereitung der Deckgläser erfolgte während der Waschschrte.

Im ersten Schritt der Färbeprozedur wurden die HDMEC im Färbefeld (groß) mithilfe des 1:500 verdünnten anti-human-vWF (rabbit)-Primärantikörpers markiert.

Dazu wurden die OT nach Abschluss der ersten Waschschrte mit den vorbereiteten Deckgläsern eingedeckt, indem der OT mit der besiedelten Vorderseite auf die vorbereiteten Deckgläser gelegt und anschließend wieder umgedreht wurde. Es folgte eine 30 minütige Inkubationszeit in einer abgedunkelten, befeuchteten Kammer bei Raumtemperatur, woran sich nach vorsichtigem Entfernen der Deckgläser erneut Waschschrte anschlossen.

Im zweiten Schritt der Färbeprozedur wurde der anti-human-vWF (rabbit)-Primärantikörper im Färbefeld (groß) durch den 1:200 verdünnten goat-anti-rabbit Cy3™-Sekundärantikörper visualisiert. Nach Inkubation und Abschluss der Waschschrte wurden im dritten Schritt der Färbeprozedur im ersten Färbefeld (klein) sowohl HDMEC, als auch HPC durch den 1:100 verdünnten anti-human-Ki67-MIB-1 (mouse)-Primärantikörper angefärbt. Gleichzeitig wurde im zweiten Färbefeld (klein) der 1:800 verdünnte anti-human- α -SMA (mouse)-Primärantikörper verwendet. Nach erneuter Inkubation und Abschluss der Waschschrte konnten im vierten Schritt der

Färbeprozedur sowohl der anti-human-Ki67-MIB-1 (mouse)-Primärantikörper, als auch der anti-human- α -SMA (mouse)-Primärantikörper mithilfe des 1:100 verdünnten goat-anti-mouse-FITC-Sekundärantikörpers visualisiert werden.

Nach Durchführung eines weiteren Waschschrilles wurden die Präparate fixiert. Dies erfolgt mittels PBS mit 4 % Paraformaldehyd für 5 min unter ständiger leichter Bewegung auf einem Schüttler. Anschließend erfolgte ein letzter einzelner Waschschrill für 5 min, bevor die 7 Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert wurden. Dazu verblieben die Präparate nacheinander für jeweils 3 min in 70-, 80- und 96-prozentigem Ethanol. Nach Lufttrocknung bei Raumtemperatur wurden die einzelnen Präparate schließlich mit Mounting Medium mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid)-Zusatz eingedeckt, der die Zellkerne der HDMEC und HPC durch Interkalieren mit der DNS blau färbt und so sichtbar macht. Bis zur Auswertung wurden die Präparate bei 4° C gelagert.

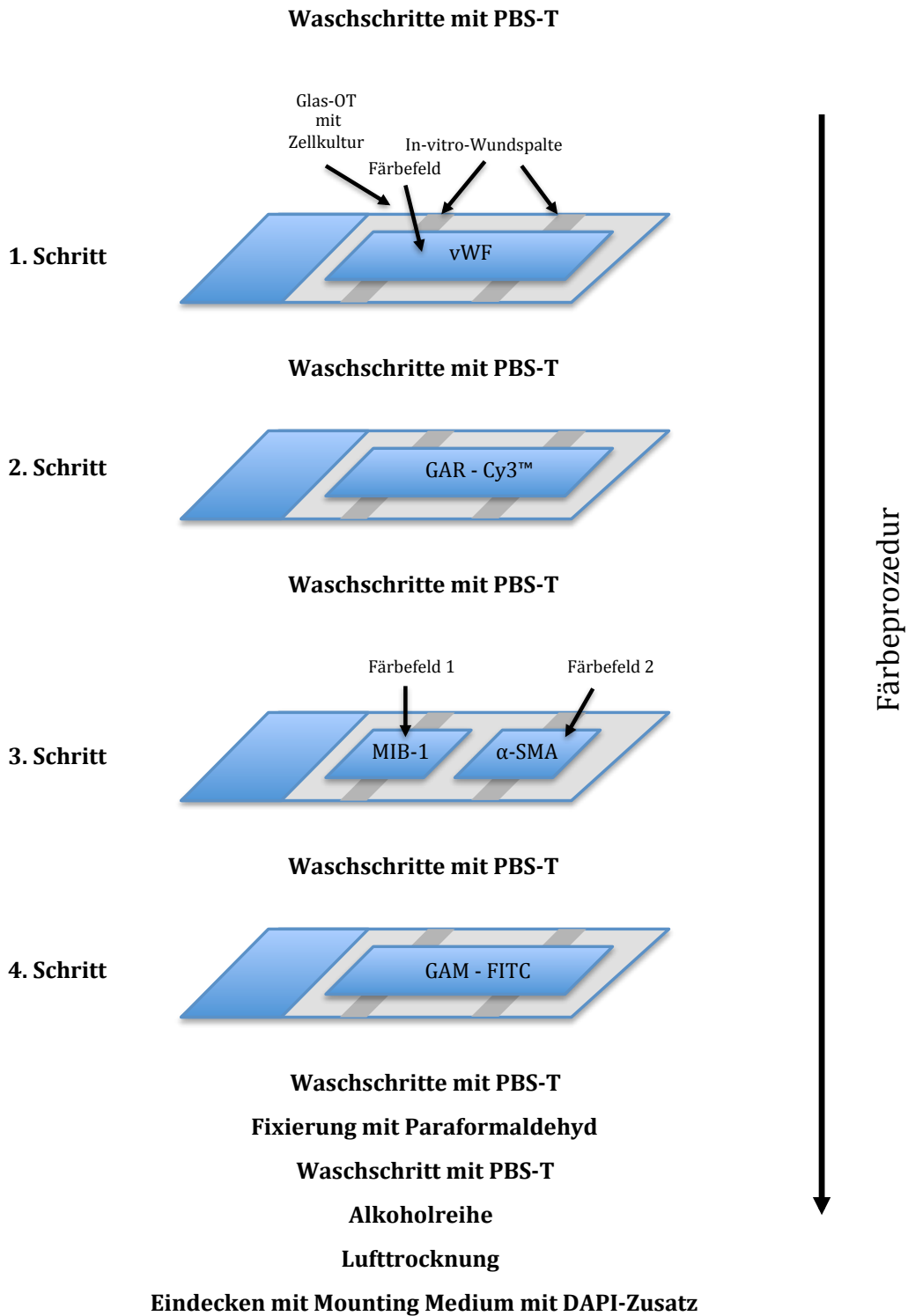


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Färbeprozedur

3.6 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

3.6.1 Funktionsprinzip und Aufbau des Fluoreszenzmikroskops



Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 Plus (Zeiss) und Computerzubehör

Zur Auswertung der Präparate wurde ein Axioskop 2 Plus der Firma Zeiss verwendet. Das von einer Quecksilberdampf-Hochdrucklampe erzeugte Licht trifft zunächst auf einen Anregungsfilter, um dann z.T. von einem dichroischen Teilerspiegel um 90° abgelenkt zu werden. Durch das Objektiv hindurch trifft das Licht nun auf das Präparat, wodurch Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden und Licht emittieren. Dieses langwelligere Licht passiert dann den dichroischen Spiegel. Anregungsfilter, dichroischer Spiegel und Emissionsfilter sind Bestandteile eines Filterwürfels, der für bestimmte Anregungs- und Emissionswellenbereiche eines Fluoreszenzfarbstoffes spezifisch ist. Der Betrachter sieht das Bild nicht direkt, sondern durch ein Okular, welches im hier verwendeten Mikroskop zehnfach vergrößert. Um ein Präparat zu dokumentieren, in Form von Bildern auf einen Computer zu übertragen und mithilfe des Bildbearbeitungsprogramms AxioVision zu bearbeiten, ist es notwendig, eine Mikroskop-Kamera (AxioCam (Zeiss)) anzuschließen.

3.6.2 Auswertung

Die Auswertung der einzelnen Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte verblindet und nach einem standardisierten Schema. Die Daten wurden unter 400-facher Vergrößerung erhoben. Es wurden insgesamt 20 Gesichtsfelder eines Objekträgers ausgewertet, die in 4 Gruppen von jeweils 5 Feldern fern der In-vitro-Wundspalte eingeteilt wurden. Es wurden die Gesamtzellzahl sowie die Zellpopulations-spezifische Zelldichte (Zellzahl pro mm^2) für HDMEC und HPC bestimmt. Der Anteil der α -SMA-positiven HPC an der Gesamt-HPC-Population wurde ebenso ermittelt. Auch der Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellen innerhalb der Zellpopulationen wurde bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde über die Auszählung von Zellen mit Mikronuklei bestimmt (Abb. 11). Zur weiteren Datenerhebung wurde das Computerprogramm Axiovision genutzt, mit dem die Vermessung der Spaltbreiten der In-vitro-Wundspalte möglich war (Abb. 12). Dazu wurden insgesamt 5 fortlaufende Gesichtsfelder über dem gesamten In-vitro-Wundspalt bei einer 50-fachen Vergrößerung ausgewertet. In jedem dieser Gesichtsfelder wurde an der 400 μm -, 800 μm - und 1200 μm -Marke einer im Computerprogramm dargestellten Skala der horizontale Abstand der zwei Zellkerne mit der größten Entfernung voneinander gemessen, sodass die Messung innerhalb aller 5 Gesichtsfelder in standardisierten Abständen erfolgte und 15 Messwerte pro Wundspalt resultierten.

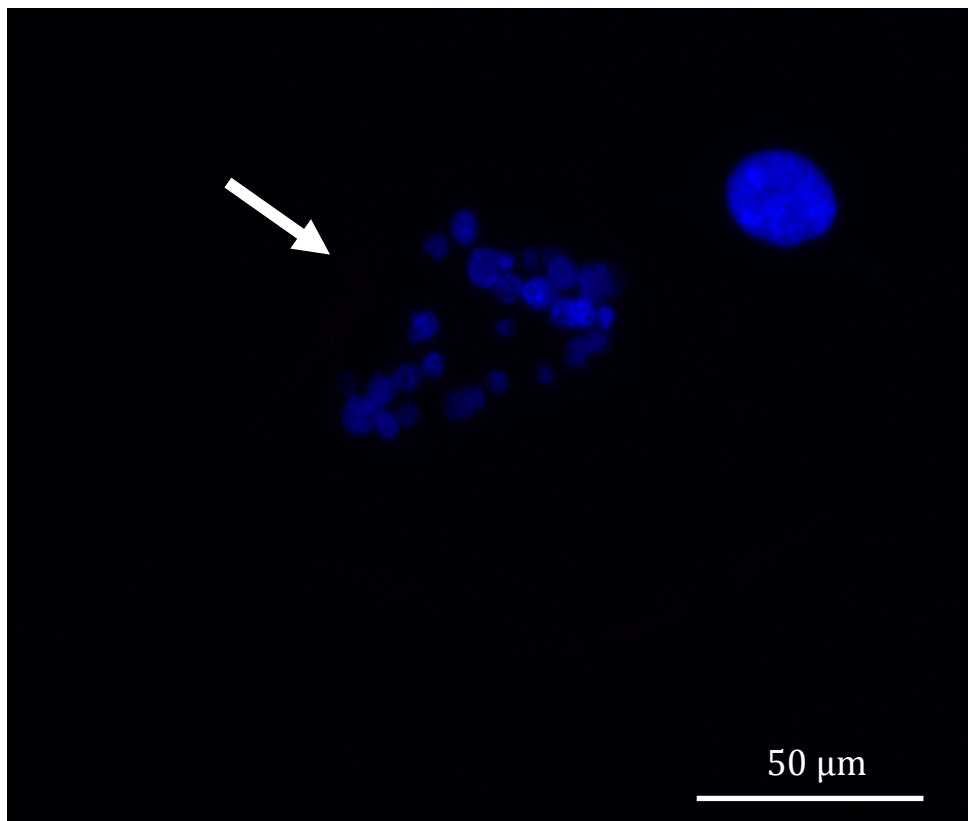


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines HPC mit Interphasekern und eines HPC mit Mikronuklei (weißer Pfeil) innerhalb einer Mono-Kultur. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gegengefärbt.

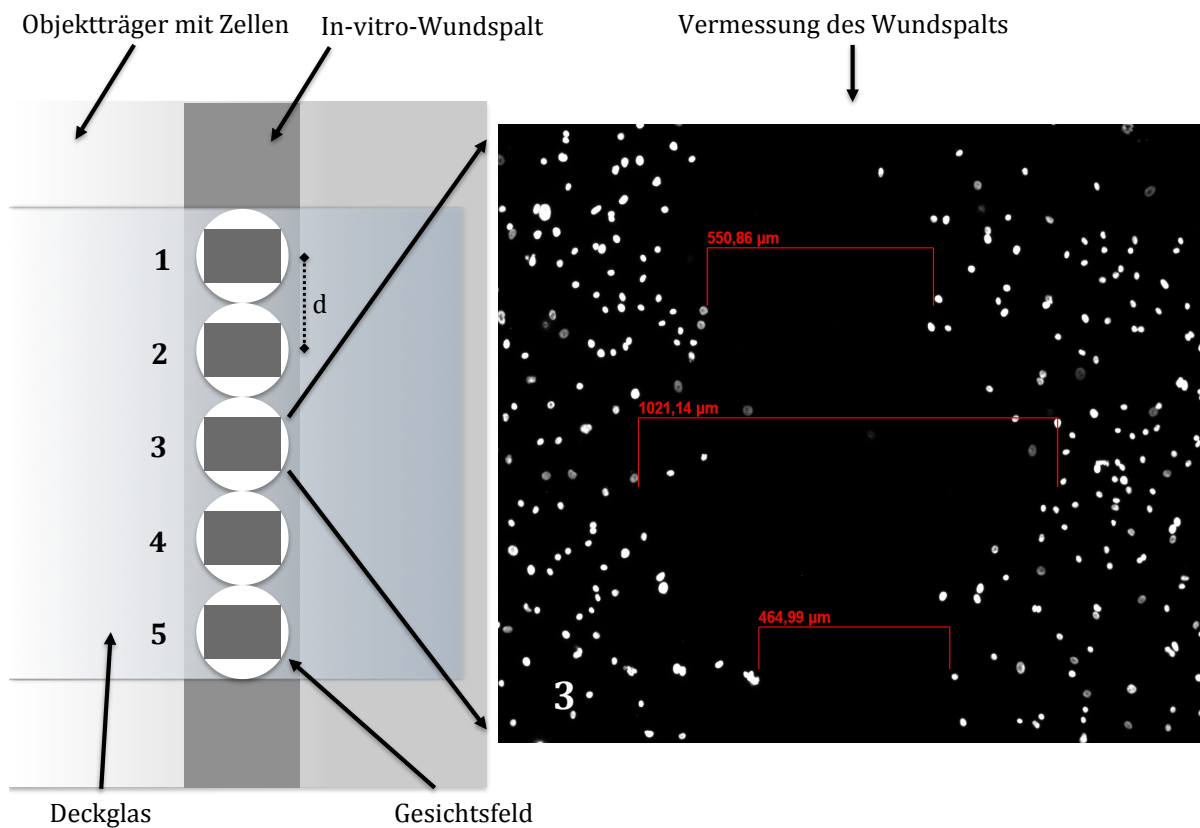


Abbildung 12: Beispiel der standardisierten Vermessung des Zellabstands entlang eines In-vitro-Wundspalts mittels fluoreszenzmikroskopischer Abbildung und AxioVision-Messtool

3.7 ELISA

3.7.1 Prinzip

Mithilfe des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) können bestimmte Antigene, Antikörper und Haptene spezifisch quantitativ in verschiedenen Untersuchungsmaterialien, wie Serum, Plasma, Urin und Zellkulturüberständen nachgewiesen werden. Dabei wird im Rahmen der Sandwich-Technik eine Mikrotiterplatte mit einem spezifischen Primärantikörper beschichtet. Daraufhin wird das zu bestimmende Antigen in unbekannter Konzentration hinzugefügt und eine gewisse Zeit lang inkubiert. Nach Auswaschen der ungebundenen Bestandteile der Probe wird ein zweiter Antikörper, der sogenannte Detektionsantikörper, hinzugefügt, der an ein Reporterenzym gekoppelt ist, wie z.B. Meerrettichperoxidase. Während der Inkubation bindet dieser zweite Antikörper an ein anderes Epitop des zu bestimmenden

Antigens und bildet so einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex, den sog. Sandwich-Komplex. Nach einem weiteren Waschschriff wird ein Substrat hinzugegeben, das von dem Enzym zu einem charakteristischen Reaktionsprodukt umgesetzt wird und photometrisch bei einer bestimmten Wellenlänge nachweisbar ist. Eine Standardreihe mit verschiedenen Verdünnungen mit bekannten Antigenkonzentrationen dient der quantitativen Auswertung, indem anhand einer Standardkurve von der gemessenen optischen Dichte der Probe auf die enthaltene Antigenkonzentration geschlossen werden kann.

In den verwendeten Zellkulturmedien dieser Studie war kein MCP-1 bzw. VEGF vor Versuchsbeginn nachweisbar.

3.7.2 Quantifizierung von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)

Ein ELISA (BD OptEIA™, human MCP-1 ELISA Kit, no. 559017, BD Biosciences, San Jose, USA) wurde genutzt, um die Konzentration von MCP-1 im Zellkulturüberstand der einzelnen Präparate zu quantifizieren. Es wurde eine mit monoklonalem anti-humanem MCP-1-Antikörper beschichtete 96-well Mikrotiterplatte verwendet. Weiterhin wurden jeweils 100 µl der Standardverdünnungen zur Erstellung einer Standardkurve sowie jeweils 100 µl der Zellkulturüberstände von den verschiedenen Kulturen (HDMEC-Mono-Kultur n=4; HPC-Mono-Kultur n=5; Co-Kultur n=4) in die jeweiligen wells pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde 5 mal mit einem vorbereiteten Waschpuffer gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers wurden jeweils 100 µl vorbereiteter Detektionsantikörper in Form eines biotinylierten, monoklonalen MCP-1-Antikörpers, gemischt mit einem Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat, hinzugefügt und anschließend für eine Stunde inkubiert. Nach 7-maligem vorsichtigem Waschen wurde 100 µl Substratgemisch, bestehend aus gleichen Teilen Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, hinzugefügt und unter Lichtschutz 30 min inkubiert. Die Farbreaktion bzw. der Substratumsatz wurde schließlich mithilfe von 50 µl 1M Phosphorsäure gestoppt. Zuletzt wurde die Absorption durch ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 450 nm und 570 nm (Referenzwellenlänge) photometrisch gemessen. Der Standarddiluent diente als Nullwert. Die gemessene

Extinktion ist proportional zur Konzentration von MCP-1, die anhand der Standardkurve ermittelt werden konnte (Magellan Software). Von allen Präparaten, bei denen Zellkulturüberstände entnommen wurden, war die Zellzahl bekannt, sodass die MCP-1-Ausschüttung pro Zelle bestimmt werden konnte.

3.7.3 Quantifizierung von VEGF (vascular endothelial growth factor)

Die Quantifizierung von VEGF erfolgte generell nach den gleichen Prinzipien wie bei der MCP-1-Quantifizierung. Ein ELISA (Quantikine® ELISA human VEGF Immunoassay, no. DVE00, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) wurde genutzt, um die Konzentration von VEGF im Zellkulturüberstand der einzelnen Präparate zu quantifizieren. In diesem Fall wurde eine mit polyklonalem anti-humanem VEGF-Antikörper beschichtete 96-well Mikrotiterplatte verwendet. Weiterhin wurden jeweils 200 µl der Standardverdünnungen zur Erstellung einer Standardkurve sowie jeweils 200 µl der Zellkulturüberstände von den verschiedenen Kulturen (HDMEC-Mono-Kultur n=4; HPC-Mono-Kultur n=3; Co-Kultur n=4) in die jeweiligen wells pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde dreimal mit einem vorbereiteten Waschpuffer gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers folgte das Hinzufügen von jeweils 200 µl vorbereitetem Detektionsantikörper in Form eines polyklonalen VEGF-Antikörpers, gemischt mit einem Meerrettichperoxidase-Konjugat, und anschließend eine zweistündige Inkubation. Nach dreimaligem vorsichtigem Waschen wurde 200 µl Substratgemisch, bestehend aus gleichen Teilen Wasserstoffperoxid und Tetramethylbenzidin, hinzugefügt und unter Lichtschutz 20 min bei RT inkubiert. Die Farbreaktion bzw. der Substratumsatz wurde schließlich mithilfe von 50 µl 1M Schwefelsäure gestoppt. Zuletzt wurde die Absorption durch ein Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 450 nm und 570 nm (Referenzwellenlänge) photometrisch gemessen. Der Standarddiluent diente als Nullwert. Die gemessene Extinktion ist proportional zur Konzentration von VEGF, die anhand der Standardkurve ermittelt werden konnte (Magellan Software). Von allen Präparaten, bei denen Zellkulturüberstände entnommen wurden, war die Zellzahl bekannt, sodass die VEGF-Ausschüttung pro Zelle bestimmt werden konnte.

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung umfasste die folgenden Parameter: Proliferation (Zellzahl und Anteil Ki-67/MIB-1-positiver Zellen), Zelldichte (Zellzahl pro mm²) jeweils für HDMEC und HPC, Anteil apoptotischer Zellen (Apoptose-Rate), Anteil α -SMA-positiver HPC, Spaltbreite der In-vitro-Wundspalte sowie die Zytokinausschüttung (MCP-1 und VEGF) innerhalb der Normoxie- und Hypoxie-Gruppen bzw. mit und ohne EPO-Supplementierung.

In die statistische Testung gingen die Mittelwerte (inkl. Standardabweichung) der einzelnen Gruppen ein.

Mittels Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend post-hoc-Test (Student-Newman-Keuls-Test) bzw. Students' t-Test wurden die Unterschiede der gemittelten Werte auf Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse wurden bei $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet.

3.9 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte und Hersteller

Geräte	Hersteller
Auswertung	
Axiovert 2 Plus	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Axiovert 25	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Digital Still Camera, Model DSC-S75	Sony, Tokyo (JPN)
Infinite M200, Mikrotiterplatten- Lesegerät	Tecan Group Ltd., Männedorf (CH)
Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss, Göttingen (D)
Picture Monitor, Model PM 9050, Ser. No. 09880	Ikegami Tsushinki Co., LTD., Tokyo (JPN)
Zellkultur	
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
Brutschrank Typ B12	Heraeus, Hanau (D)
CASY Zellzählsystem, Modell TT; Ser. No. TT-2EC-1196	Schärfesystem GmbH, Reutlingen (D)
Celloshaker Variospeed Variotime	Renner GmbH, Darmstadt (D)
Pipettus-Akku Hirschmann Laboratories	Hirschmann GmbH, Eberstadt (D)
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau (D)
Wasserbad TWB12	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach (D)
Zentrifuge Hermle Z400K	Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen (D)

3.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Endothelzell-Kultivierung	
Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-22022	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC), Cat. No. C-12210	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
SupplementMix Endothelial Cell Growth Medium MV, Cat. No. C-39225	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Perizyten-Kultivierung	
Human Pericytes from Placenta (hPC-PL), Cat. No. C-12980	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Pericyte Growth Medium, Cat. No. C-22040	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
SupplementMix Pericyte Growth Medium, Cat. No. C-39840	PromoCell GmbH, Heidelberg (D)
Primärantikörper (anti human)	
Factor VIII Related Antigen/von Willebrand FactorAb-1, Rabbit Polyclonal Antibody, Cat. No. 12880	dianova GmbH, Hamburg (D)
monoclonal anti- α Smooth Muscle Actin, Product No. A 2547	Sigma, Saint Louis (USA)
mouse anti Ki-67/MIB-1, no. M7240,	Dakocytomation, Glostrup, Denmark
Sekundärantikörper	
Cy3-conjugated AffiniPure F(ab)2 Fragment Goat Anti-Rabbit IgG Code No. 111-166-045	dianova GmbH, Hamburg (D)
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG Code No. 115-095-003	dianova GmbH, Hamburg (D)
ELISA	
BD OptEIA™, human MCP-1 ELISA Kit, no. 559017	BD Biosciences, San Jose, USA
Quantikine® ELISA human VEGF Immunoassay, no. DVE00	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Arbeitsutensilien	
10 ml sterile Einmal-Pipetten, Cat. No. 607 180	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
5 ml sterile Einmal-Pipetten, Cat. No. 606 180	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Deckglas klein 18x18mm, Cat. No. 631-1567	VWR international, Darmstadt (D)
Deckgläser 24 x 50 mm, Cat. No. 631-0146	VWR international, Darmstadt (D)
Einmal-Pasteurpipette 3ml Kontroll-Nr.: 10021141 no. EA 66.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Eppendorf Research Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 0,5-10 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Eppendorf Research Pipetten 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Küvetten aus Glas, Kat. Nr. H 550.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Objektträger 76 x 26 mm, geschnitten mit Mattrand	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
QuadriPERM: steril, Cat. No. 96077308	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Reagenzröhrchen steril, PP-Test tubes, 50 ml, Cat. No. 227261	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
1000 µl -Pipettenspitze zum Scratches: Biosphere Filter tips Cat. No. 70.762.211	Sarstedt, Nümbrecht (D)
T25-Kulturflasche klein, steril, 25 cm ² , 50 ml, Cat. No. 690 175	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
T75-Kulturflasche groß, steril, 75 cm ² , 250 ml, Cat. No. 658 175	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Chemikalien/Lösungen	
Aqua dest., Reinstwasseranlage Arium 661	Sartorius AG, Göttingen (D)
Bovines Serumalbumin (BSA) Cat. No.: 10 238 040 001	Roche Diagnostics, Mannheim (D)
DAPI Mounting Medium (4',6-Diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid Cat. No. H-1200)	Vector Laboratories, Burlingame Inc. (USA)
Ethanol min. 99,9% Vol., Sorte 642	Berkel, Ludwigshafen (D)
Gas, zertifiziertes, 95% N ₂ , 5% CO ₂	Messer, Griesheim (D)
Glycerol, Kat. Nr. 3783.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Isopropanol, 70%	Berkel, Ludwigshafen (D)
Methanol, Kat. Nr. 4637.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Paraformaldehyd Cat. No. 1.04005.1000	Merck, Darmstadt
PBS Phosphate Buffered Saline, Tablets, No. BR0014G	Oxoid Limited, Hampshire (GB)
Trypsin EDTA, UV-inaktiviert (1:250), 1-fach Konzentrat Kat. Nr. L11-660	PAA Laboratories GmbH, Cölbe (D)
Tween 20, Art. Nr. 9127.2	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe (D)

4. Ergebnisse

4.1 Spaltschluss

Durch die Bestimmung der Spaltbreite konnte das Migrationsverhalten der Zellen in Mono- und Co-Kultur beurteilt werden. Hierzu wurde der In-vitro-Wundspalt nach zuvor beschriebenem Schema vermessen (siehe 3.6.2; Abb. 12).

4.1.1 Mono-Kulturen

4.1.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Migration der HDMEC war unter Normoxie und Hypoxie generell unterschiedlich (siehe Abb. 13). Nur unter Normoxie kam es zu einer deutlichen Abnahme der Spaltbreite über die Zeit. Die mittlere initiale Spaltbreite (T0K) von 806 μm war nach 18 h Normoxie (T1K) mit 659 μm und nach 48 h Normoxie (T2K) mit 372 μm signifikant verringert. Dies war mit 703 μm nach 18 h und 381 μm ebenso der Fall für die normoxischen EPO-Gruppen (T1KE, T2KE). Es zeigte sich für die Spaltbreite unter Hypoxie nach 18 h (T1H) mit 818 μm bzw. unter EPO-Supplementierung (T1HE) mit 826 μm kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert (T0K).

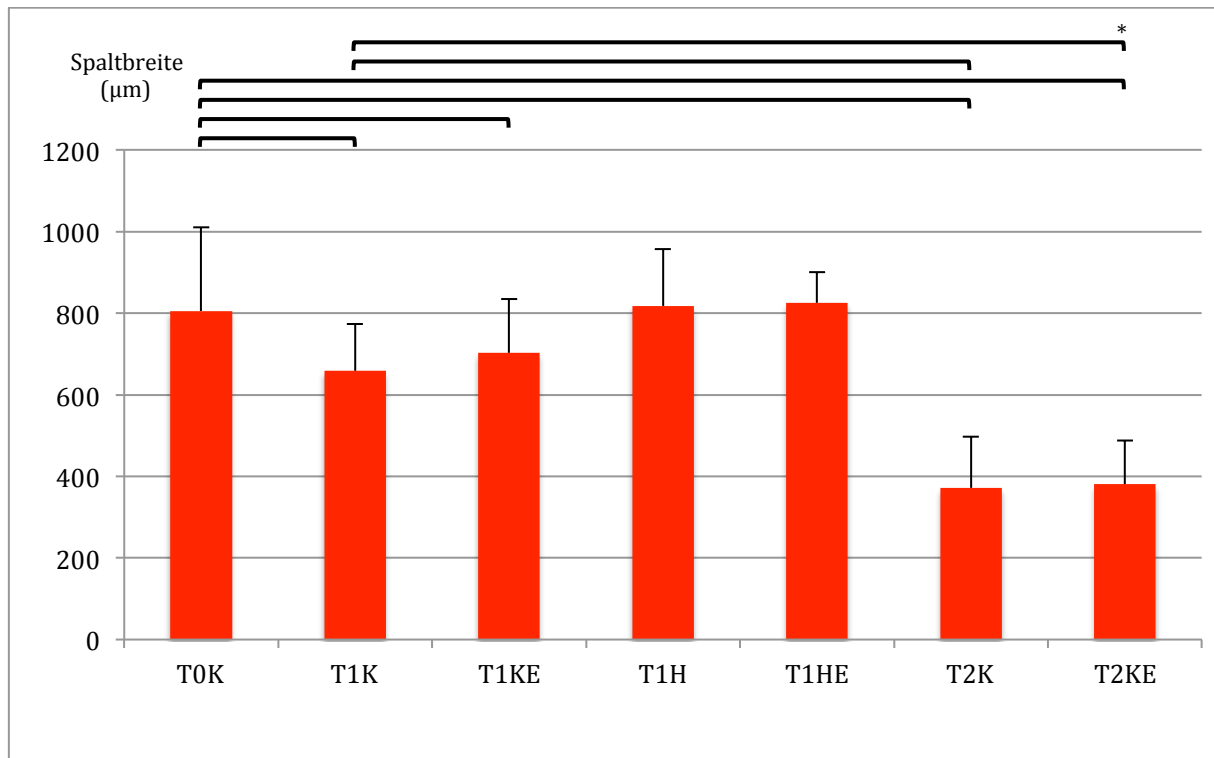


Abbildung 13: Spaltbreite der HDMEC-Mono-Kulturen

Spaltbreite in µm der HDMEC-Mono-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.1.1.2 Humane Perizyten

Auch bei den HPC-Mono-Kulturen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Normoxie- und Hypoxie-Gruppen (siehe Abb. 14). Die initiale Spaltbreite von 1170 µm (T0K) nahm innerhalb von 18 h Normoxie (T1K) auf 848 µm ab. Nach 42 h Normoxie (T2K) verringerte sie sich signifikant auf 626 µm. Innerhalb der normoxischen Gruppen mit EPO-Supplementierung zeigte sich nach 18 h (T1KE) mit 905 µm eine tendenzielle Verminderung der Spaltbreite, wobei nach insgesamt 42 h Normoxie und EPO-Supplementierung (T2KE) im Vergleich zum Ausgangswert (T0K) sowie zu den 18 h Normoxie-Gruppen (T1K, T1KE) die Spaltbreite auf bis zu 478 µm signifikant abnahm.

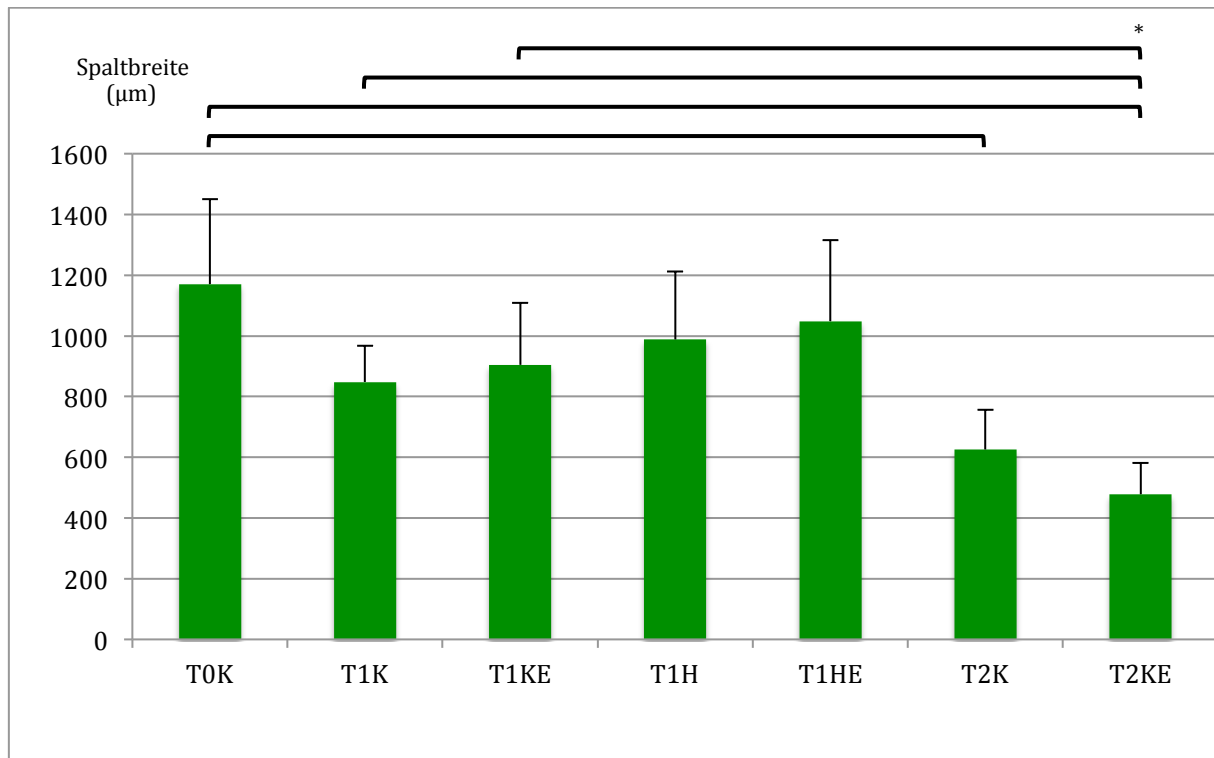


Abbildung 14: Spaltbreite der HPC-Mono-Kulturen

Spaltbreite in µm der HPC-Mono-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.1.2 Co-Kultur

Im Gegensatz zu den Mono-Kulturen verringerte sich die initiale Spaltbreite (T0K) von 732 µm innerhalb der Co-Kulturen in allen Gruppen, auch unter hypoxischen Bedingungen (T1H, T1HE) signifikant (siehe Abb. 15). Nach 18 h unter normoxischen Bedingungen (T1K) verringerte sich die Spaltbreite auf 555 µm bzw. 225 µm nach 42 h (T2K). Unter hypoxischen Bedingungen (T1H) war der Spaltschluss mit 635 µm etwas geringer. Im Vergleich zum Korrelat ohne EPO-Supplementierung zeigte sich die Spaltbreite nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE) mit 633 µm nicht verändert. Auch unter normoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung war nach 18 h (T1KE) mit 519 µm bzw. nach 42 h (T2KE) mit 353 µm die Spaltbreite gegenüber dem Ausgangswert (TOK) signifikant verringert.

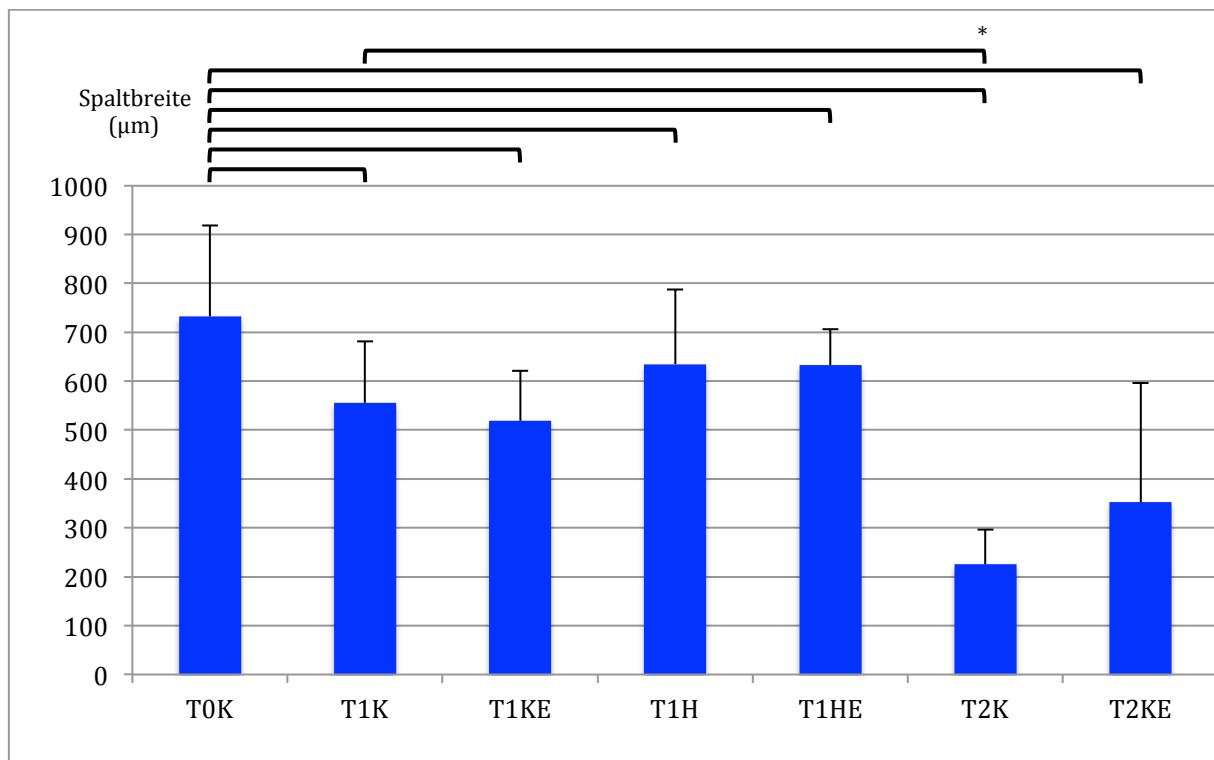


Abbildung 15: Spaltbreite der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Spaltbreite in µm der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.1.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur

Der Vergleich des Spaltschlusses der Mono-Kulturen aus HDMEC mit dem der Co-Kulturen zeigte einen tendenziell stärkeren Spaltschluss bei den Co-Kulturen (siehe Abb. 16). Nach 18 h unter hypoxischen Bedingungen (T1H) war der Spaltschluss in der Co-Kultur signifikant besser als in Mono-Kultur. Die Gruppen mit EPO-Supplementierung (T1KE, T1HE, T2KE) zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den Gruppen ohne EPO-Supplementierung (T1K, T1H, T2KE).

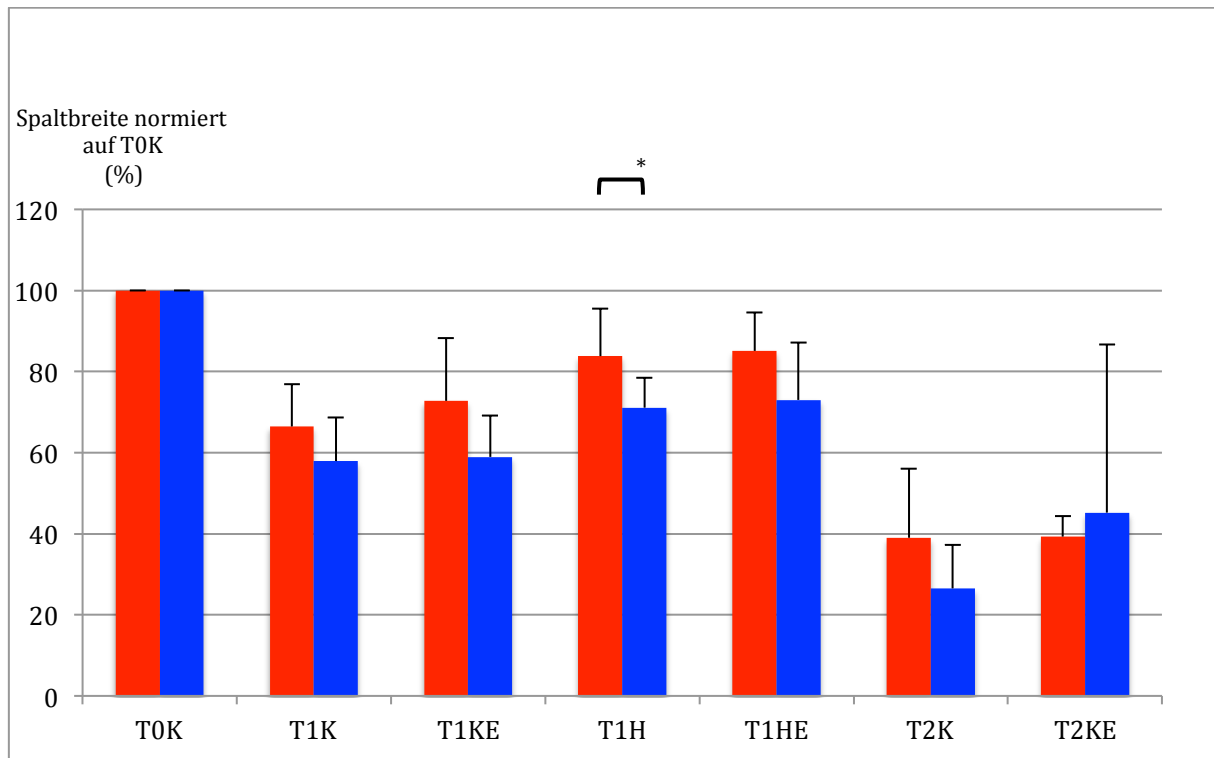


Abbildung 16: Vergleich der relativen Spaltbreite der HDMEC-Mono-Kulturen und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Vergleich der verbleibenden Spaltbreite in % der initialen Spaltbreite der HDMEC-Mono-Kulturen (■, n=6) und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Der prozentuale Spaltschluss der Mono-Kulturen aus HPC verglichen mit den Co-Kulturen zeigte eine tendenziell stärkeren Spaltschluss innerhalb der Co-Kulturen verglichen mit den Mono-Kulturen (siehe Abb. 17). Insbesondere war dies deutlich nach 18 h unter normoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung (T1KE) sowie nach 42 h (T2K).

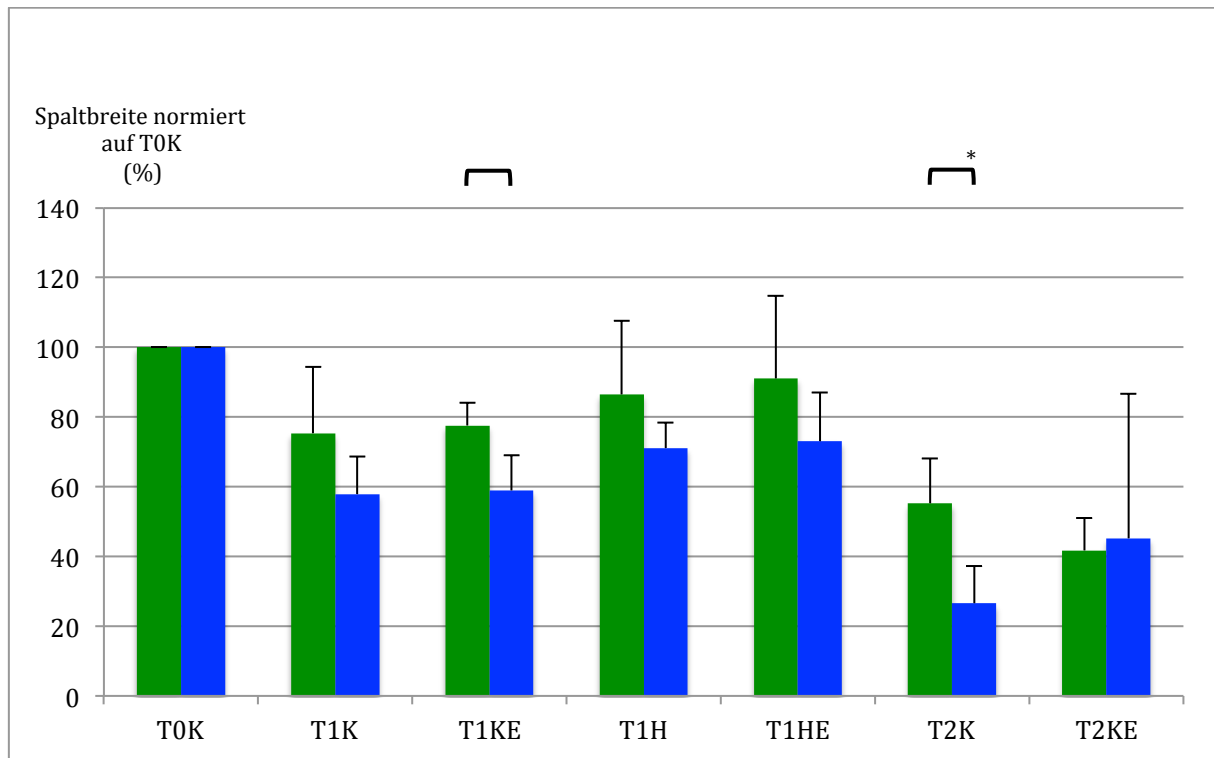


Abbildung 17: Vergleich der relativen Spaltbreite der HPC-Mono-Kulturen und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Vergleich der verbleibenden Spaltbreite in % der initialen Spaltbreite der HPC-Mono-Kulturen (■, n=6) und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; * $p \leq 0,05$.

4.2 Proliferation: Zelldichte

4.2.1 Mono-Kulturen

4.2.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Zelldichte (Zellen pro mm²) der HDMEC-Mono-Kulturen stieg von initial (T0K) 133 Zellen pro mm² über 208 Zellen pro mm² nach 18 h Normoxie (T1K) auf 330 Zellen pro mm² nach 42 h Normoxie (T2K; siehe Abb. 18). Die Zellen proliferierten innerhalb der Hypoxie-Gruppen (T1H, T1HE) nach 18 h tendenziell weniger im Vergleich zu den Kulturen unter normoxischen Bedingungen (T1K, T1KE). Die Gruppen mit EPO-Supplementierung (T1KE, T1HE, T2KE) zeigten generell keinen Unterschied zu den referierenden Gruppen ohne Supplementierung (T1K, T1H, T2K).

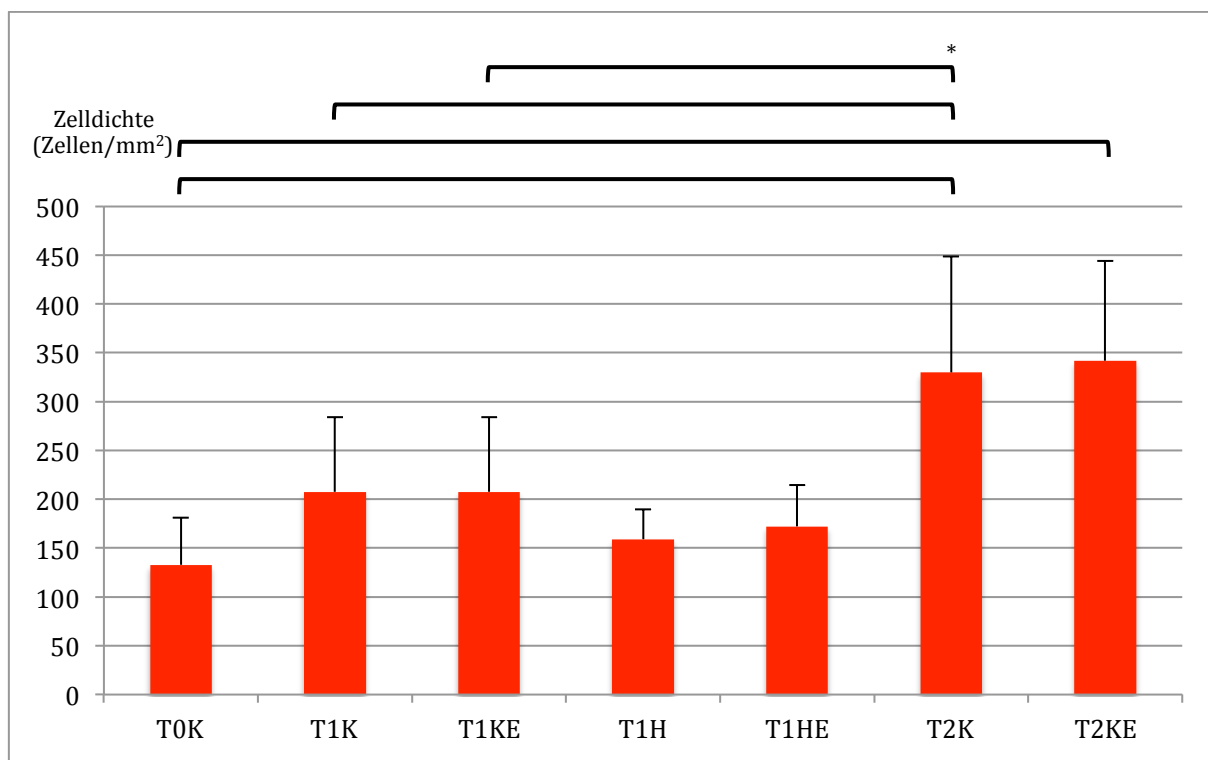


Abbildung 18: Zelldichte der Mono-Kulturen aus HDMEC

Zelldichte (Anzahl der Zellen pro mm²) der HDMEC-Mono-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.2.1.2 Humane Perizyten

Die Zelldichte der HPC-Mono-Kulturen stieg von initial 65 Zellen pro mm² (T0K) über 105 Zellen pro mm² nach 18 h Normoxie (T1K) auf 308 Zellen pro mm² nach 42 h Normoxie (T2K) signifikant an (siehe Abb. 19). Die Proliferation stieg mit 90 Zellen pro mm² in der Hypoxie-Gruppe (T1H) weniger stark an. Die Kulturen mit EPO-Supplementierung zeigten mit 102 Zellen pro mm² nach 18 h (T1KE) und 311 Zellen pro mm² nach 42 h Normoxie (T2KE) ebenfalls einen signifikanten Anstieg der Zelldichte, wobei nach 18 h kein Unterschied der Hypoxie-Gruppen (T1H, T1HE) zur jeweiligen Kontroll-Gruppe (T1K, T1KE) bestand.

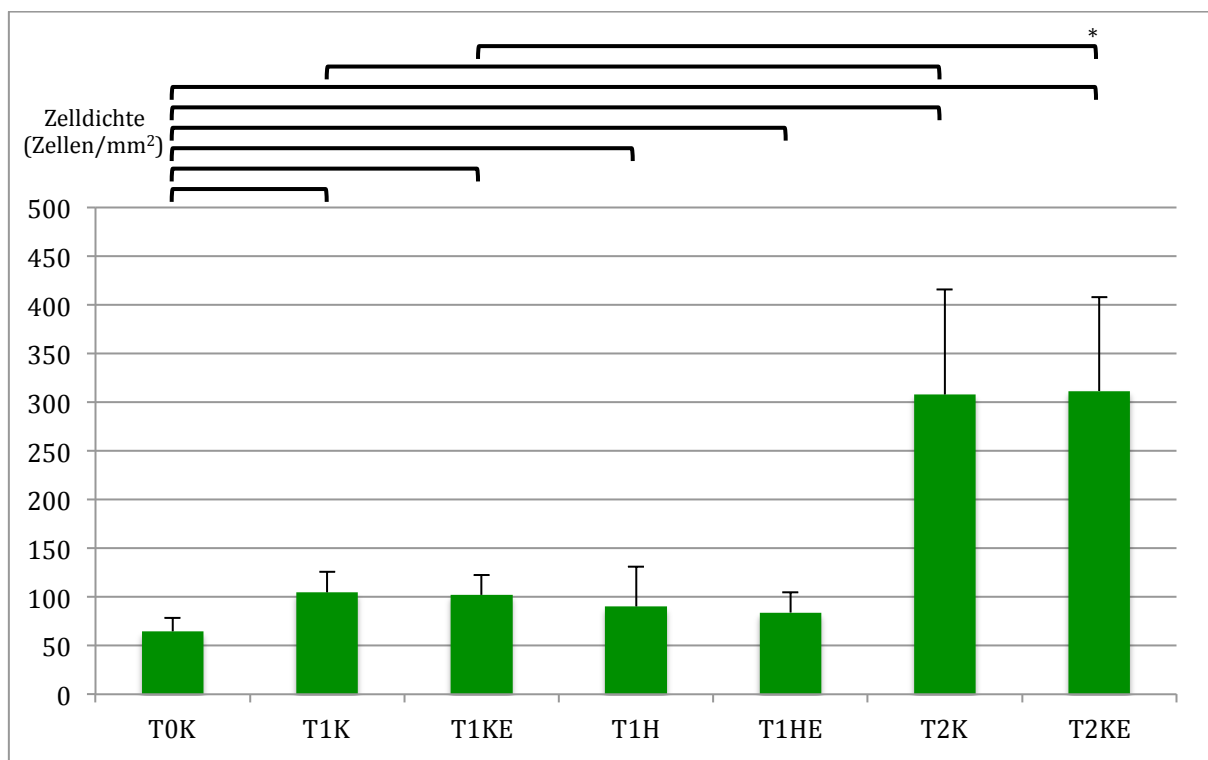


Abbildung 19: Zelldichte der Mono-Kulturen aus HPC

Zelldichte (Anzahl der Zellen pro mm²) der HPC-Mono-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.2.2 Co-Kultur

Die Zelldichte der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC stieg von initial 195 Zellen pro mm² an Tag 0 (T0K) über 306 Zellen pro mm² nach 18 h Normoxie (T1K) bis auf 463 Zellen pro mm² nach 42 h Normoxie (T2K; siehe Abb. 20). Die Zelldichte nach 18 h Hypoxie (T1H) war in diesem Fall mit 209 Zellen pro mm² signifikant niedriger als die Zelldichte nach 18 h Normoxie (T1K) mit 306 Zellen pro mm². Dieser Unterschied war innerhalb der HDMEC- und HPC-Mono-Kulturen nicht signifikant. Die Gruppen mit EPO-Supplementierung (T1KE, T1HE, T2KE) zeigten im Vergleich zu den Kontroll-Gruppen (T1K, T1H, T2K) keine Unterschiede und demnach keinen negativen Effekt von EPO.

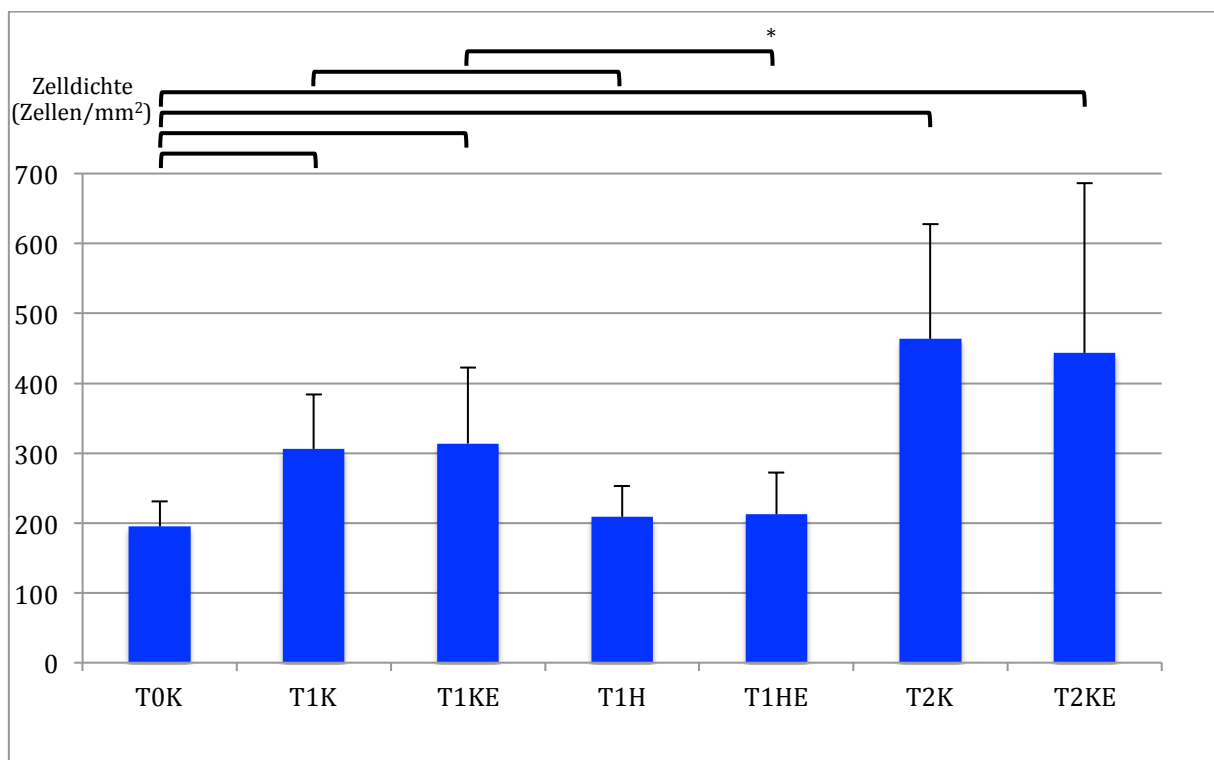


Abbildung 20: Zelldichte der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Zelldichte (Anzahl der Zellen pro mm²) der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.2.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur

Im Vergleich der Zelldichten der HDMEC innerhalb der Mono- und Co-Kulturen fiel auf, dass HDMEC in Mono-Kulturen generell eine höhere Dichte aufwiesen als HDMEC in Co-Kulturen (siehe Abb. 21). Es zeigte sich, dass dieser Unterschied unter Hypoxie (T1H, T1HE) am stärksten ausgeprägt war, wobei die HDMEC-Zelldichte innerhalb der Co-Kulturen mit 98 % bzw. 95 % sogar unter dem Ausgangswert lag. Die EPO-Supplementierung zeigte keinen negativen Effekt in dem dargestellten Zusammenhang. Die Zelldichte stieg innerhalb der Co-Kulturen bezogen auf den Ausgangswert an Tag 0 (T0K) auf 147 % nach 18 h Normoxie (T1K) und auf 206 % nach 42 h Normoxie (T2K). Innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen zeigte sich mit 157 % nach 18 h Normoxie (T1K) und mit 258 % nach 42 h Normoxie (T2K) eine tendenziell bessere Proliferation.

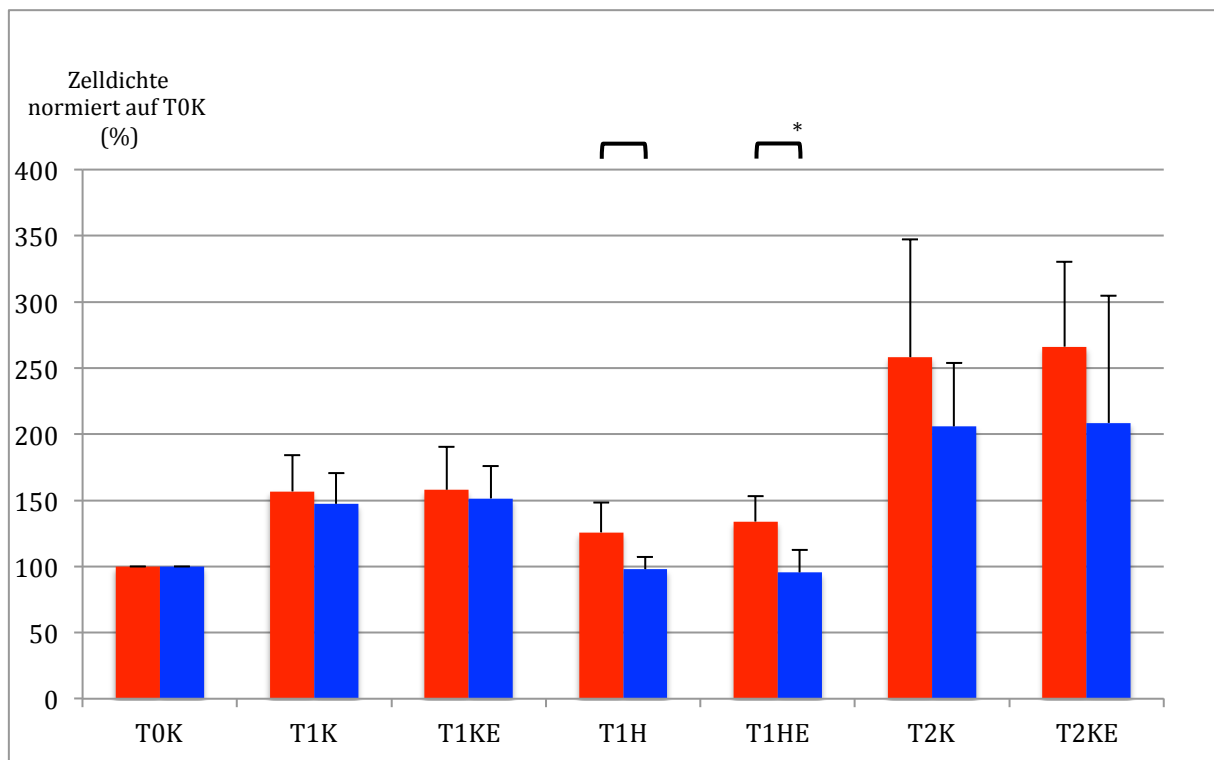


Abbildung 21: Vergleich der Zelldichten der HDMEC-Populationen innerhalb der Mono- und Co-Kulturen

Vergleich der auf T0K normierten Zelldichten in % von HDMEC in Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

Die Zelldichte der HPC innerhalb der Co-Kulturen stieg nach 18 h Normoxie (T1K) über 178 % auf 320 % des Ausgangswertes nach 42 h Normoxie (T2K; siehe Abb. 22). Diese Entwicklung war zunächst vergleichbar mit der innerhalb der Mono-Kulturen, in denen die Zelldichte nach 18 h Normoxie (T1K) auf 164 % stieg. Allerdings zeigte sich ein im Vergleich zur Co-Kultur signifikanter Anstieg der Proliferationsrate innerhalb der Mono-Kulturen nach 42 h Normoxie (T2K) auf 466 % sowie 474 % des Ausgangswertes nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Dies lässt die Vermutung eines unterdrückenden Effektes der HDMEC auf die Proliferationsrate der HPC innerhalb der Co-Kulturen zu. Die hypoxischen Bedingungen (T1H, T1HE) zeigten einen generell hemmenden Effekt auf die Proliferationsrate der Zellen, allerdings wurde ein Unterschied zwischen Co- und Mono-Kultur bezogen auf die HPC in diesem Zusammenhang nicht deutlich. Die EPO-Supplementierung (T1KE, T1HE, T2KE) erbrachte keinen Nachweis eines Effektes auf die Proliferationsrate der Kulturen.

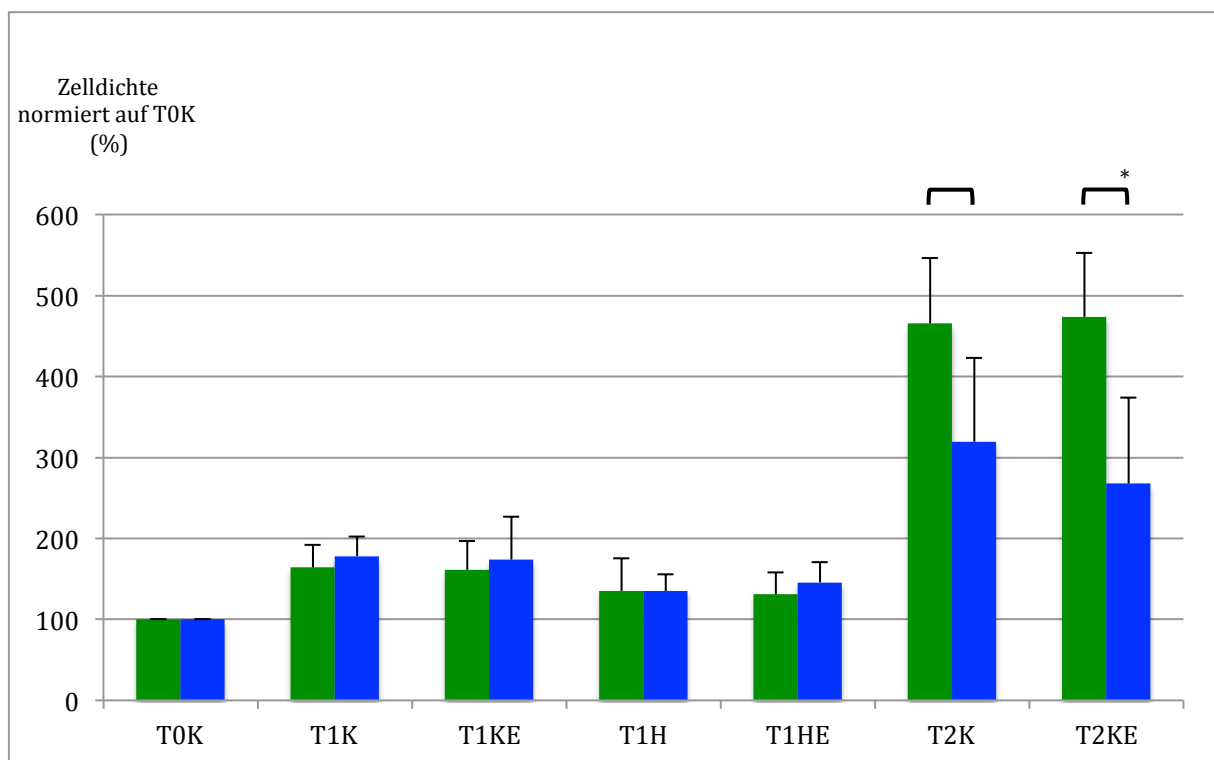


Abbildung 22: Vergleich der Zelldichten der HPC-Populationen innerhalb der Mono- und Co-Kulturen

Vergleich der auf T0K normierten Zelldichten in % von HPC in Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.3 Proliferation: Ki-67/MIB-1

4.3.1 Mono-Kulturen

4.3.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Der prozentuale Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven HDMEC innerhalb der Mono-Kulturen betrug initial 42 % (T0K), stieg innerhalb von 18 h (T1K) tendenziell auf 49 % und verblieb nach insgesamt 42 h unter normoxischen Bedingungen (T2K) bei 49 % (siehe Abb. 23). Nach 18 h unter hypoxischen Bedingungen (T1H) war der Anteil mit 37 % tendenziell geringer als initial nach Versuchsbeginn (T0K). Die EPO-Supplementierung resultierte mit 51 % nach 18 h (T1KE) sowie mit je 49 % nach 42 h Normoxie (T2KE) und Hypoxie (T1HE) in vergleichbaren Werten zu den Kulturen ohne EPO-Supplementierung (T1K, T2K, T1H).

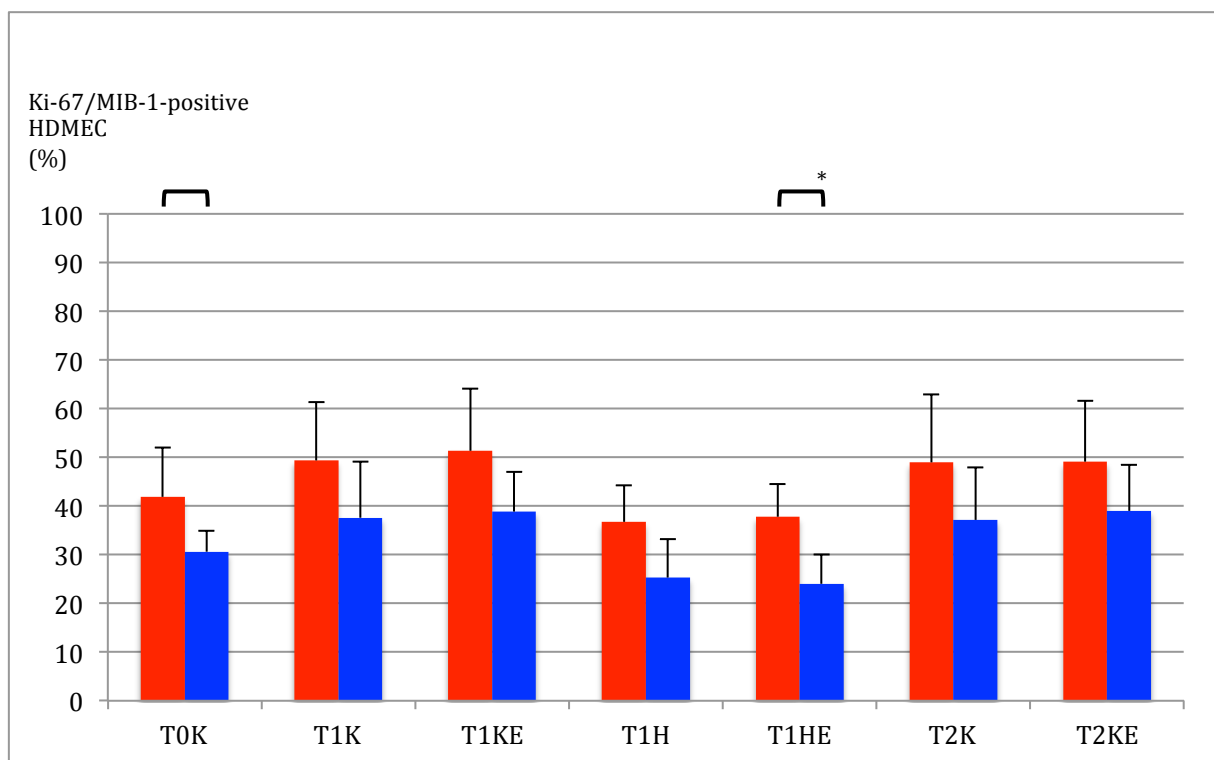


Abbildung 23: Zellzyklusanalyse der HDMEC-Populationen innerhalb der Mono- und Co-Kulturen

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellnuklei der HDMEC in Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.3.1.2 Humane Perizyten

Der Ki-67/MIB-1-positive Anteil der HPC-Population innerhalb der Mono-Kulturen stieg von initial 35 % (T0K) über 81 % nach 18 h (T1K) bis auf 87 % nach 42 h Normoxie (T2K) signifikant an (siehe Abb. 24). Auch unter hypoxischen Bedingungen befanden sich 69 % (T1H) der HPC in einer proliferativen Zellzyklusphase. Die EPO-Supplementierung zeigte mit 83 % nach 18 h (T1KE) und 88 % nach 42 h Normoxie (T2KE) sowie mit 70 % nach 18 h Hypoxie (T1HE) eine tendenziell positive Wirkung auf die Proliferation im Vergleich zu den Korrelaten ohne EPO-Supplementierung (T1K, T2K, T1H).

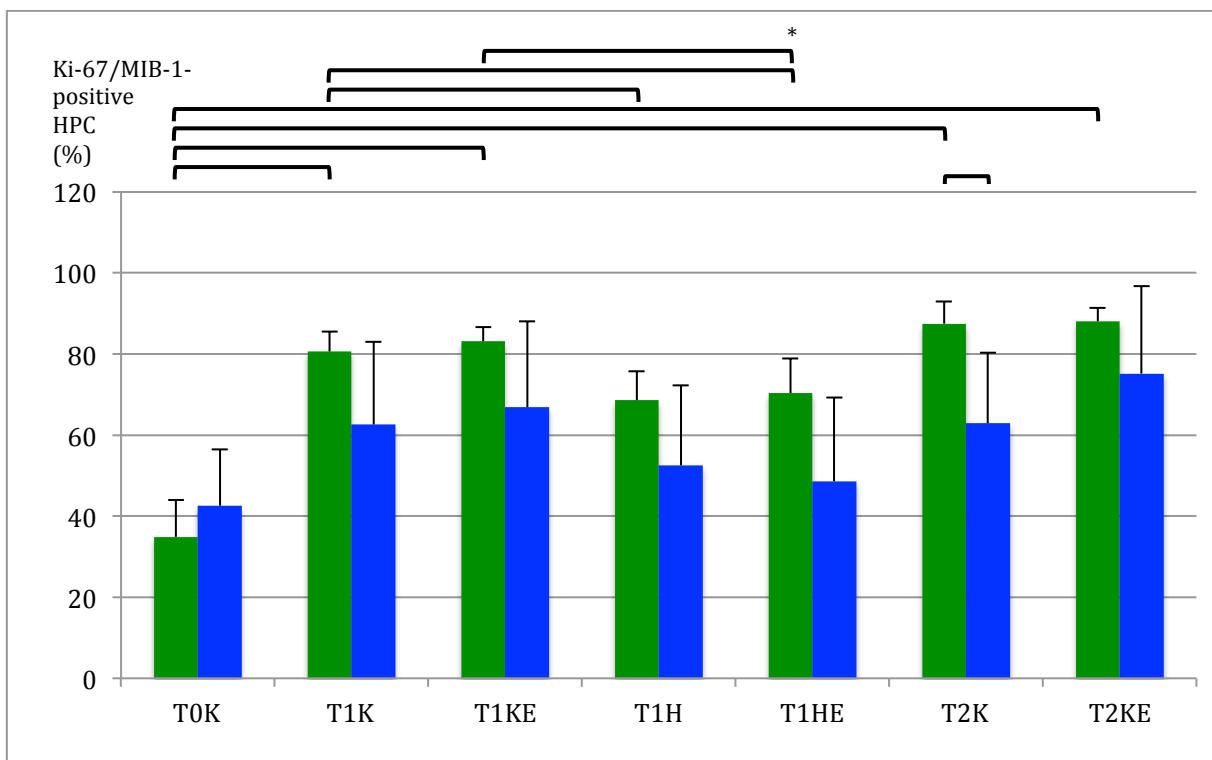


Abbildung 24: Zellzyklusanalyse der HPC-Populationen innerhalb der Mono- und Co-Kulturen

Prozentualer Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellnuklei der HPC in Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.3.2 Co-Kultur

Die Ki-67/MIB-1-positive HDMEC-Population innerhalb der Co-Kulturen betrug 31 % an T0K, erhöhte sich tendenziell unter Normoxie nach 18 h (T1K) auf 38 % und verblieb nach 42 h (T2K) bei 37 % (siehe Abb. 23). Die hypoxischen Bedingungen reduzierten den proliferierenden Populationsanteil nach 18 h (T1H) tendenziell auf 25 %. Die EPO-Supplementierung zeigte mit 39 % nach 18 h (T1KE) sowie mit 39 % nach 42 h Normoxie (T2KE) und mit 24 % nach 18 h Hypoxie (T1HE) keinen negativen Effekt auf den Anteil proliferierender Zellen im Vergleich zu den Gruppen ohne EPO-Supplementierung.

Innerhalb der Perizyten nahm der Ki-67/MIB-1-positive Populationsanteil innerhalb der Co-Kulturen initial 43 % (T0K) ein, belief sich nach 18 h Normoxie (T1K) auf 63 % und verblieb schließlich bei 63 % nach 42 h Normoxie (T2K; siehe Abb. 24). Die hypoxischen Bedingungen sorgten für einen tendenziell geringeren Anstieg des proliferierenden Zellanteils auf 53 % (T1H). HPC konnten von T0K nach T1H den Anteil proliferierender Zellen tendenziell erhöhen, während bei HDMEC dort ein tendenzieller Abfall erfolgte. Die EPO-Supplementierung resultierte mit 67 % nach 18 h Normoxie (T1KE) und mit 75 % nach 42 h Normoxie (T2KE) in einer positiven Tendenz im Vergleich zu den Gruppen ohne EPO-Supplementierung (T1K, T2K).

4.3.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur

Im Vergleich der Mono- mit den Co-Kulturen fiel auf, dass der Anteil der proliferierenden HDMEC innerhalb der Mono-Kulturen generell höher war (siehe Abb. 23). Dieser Unterschied war insbesondere innerhalb der Hypoxie-Gruppe mit EPO-Supplementierung (T1HE) signifikant. Dies spricht für einen hemmenden Einfluss der HPC auf die HDMEC innerhalb der Co-Kulturen insbesondere unter Hypoxie und EPO-Supplementierung.

Ebenso war der Anteil der Ki-67/MIB-1-positiven Zellen der HPC in den Mono-Kulturen zwar initial niedriger, aber im Zeitverlauf tendenziell höher als innerhalb der Co-Kulturen (siehe Abb. 24). Dieser Unterschied war insbesondere nach 42 h Normoxie (T2K) signifikant. Dieses Ergebnis deutet auf einen generell hemmenden Effekt, verursacht durch die Zell-Zell-Interaktion innerhalb der Co-Kulturen, hin.

4.4 Apoptose

4.4.1 Mono-Kulturen

4.4.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Der Anteil der apoptotischen Zellen innerhalb der Mono-Kulturen aus HDMEC stieg tendenziell von initial 0,93 % (T0K) auf 1,42 % nach 18 h (T1K) und verblieb bei 1,42 % nach insgesamt 42 h (T2K) unter normoxischen Bedingungen (siehe Abb. 25). Nach 18 h unter hypoxischen Bedingungen (T1H) zeigte sich mit 1,16 % kein Unterschied zur normoxischen Gruppe (T1K). Die EPO-Supplementierung erbrachte nach 18 h mit 1,34 % (T1KE) sowie mit 1,38 % nach 42 h Normoxie (T2KE) und mit 1,14 % nach 18 h Hypoxie (T1HE) keinen Unterschied zum jeweiligen Korrelat (T1K, T2K, T1H).

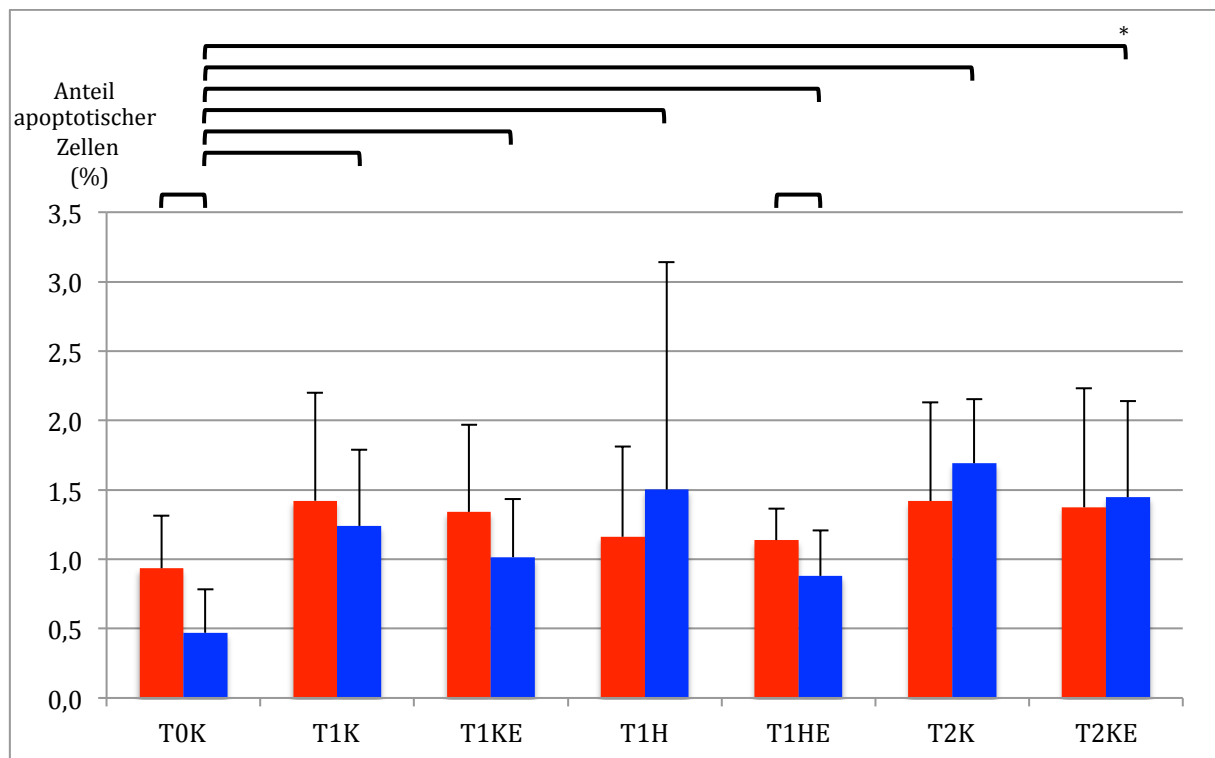


Abbildung 25: Apoptose-Rate der HDMEC-Mono-Kulturen und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Apoptotische Zellen in % aller Zellen der HDMEC-Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.4.1.2 Humane Perizyten

Die Apoptose-Rate der HPC stieg tendenziell von initial 0,5 % (T0K) auf 1,51 % nach 18 h (T1K) und schließlich auf 2,16 % nach insgesamt 42 h unter normoxischen Bedingungen (T2K; siehe Abb. 26). Unter Hypoxie zeigte sich nach 18 h mit 1,46 % (T1H) eine mit T1K vergleichbare Apoptose-Rate. Die EPO-Supplementierung zeigte nach 18 h mit 1,83% (T1KE) und mit 2,20 % nach 42 h Normoxie (T2KE) eine mit den Gruppen ohne EPO-Supplementierung vergleichbare Apoptose-Rate. Interessanterweise war die Apoptose-Rate nach 18 h unter hypoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung (T1HE) nur auf 1,09 % gestiegen, was ein signifikant niedrigerer Wert als unter normoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung (T1KE) war. Dies weist auf einen positiven Effekt von EPO gerade unter hypoxischen Bedingungen hin.

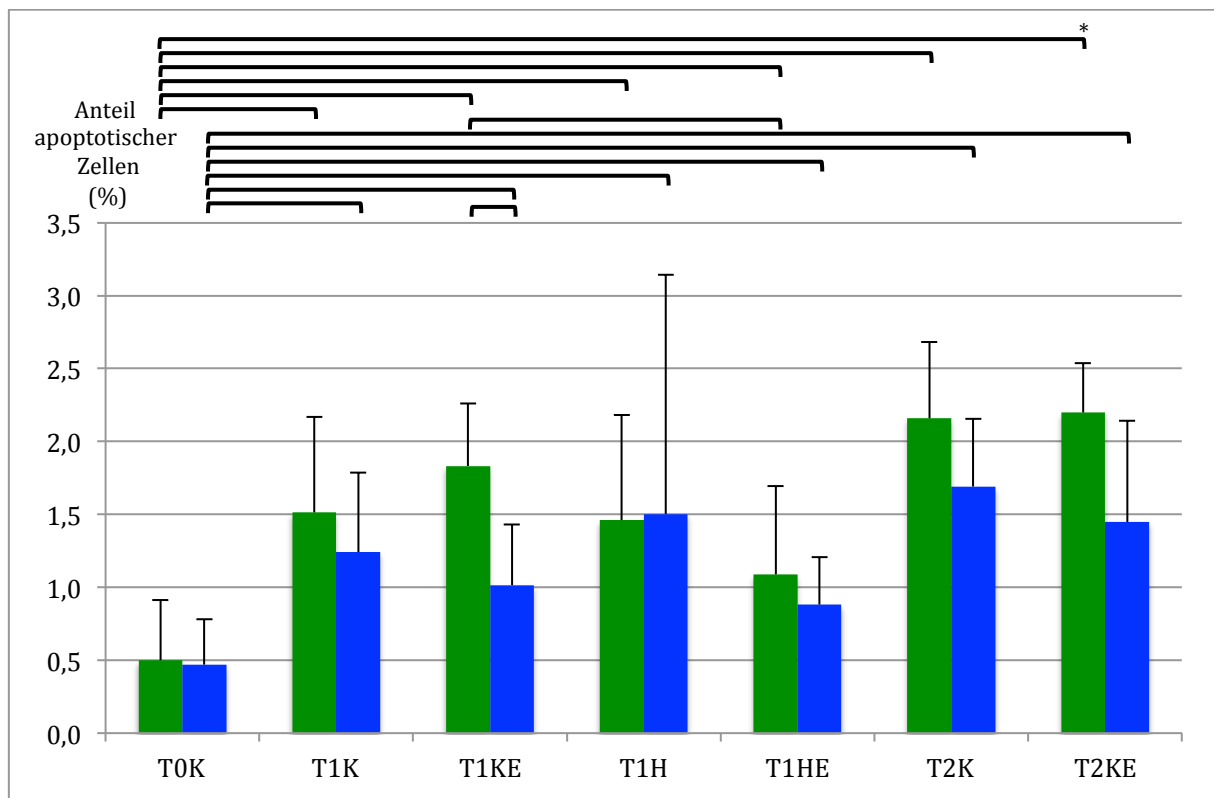


Abbildung 26: Apoptose-Rate der HPC-Mono-Kulturen und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Apoptotische Zellen in % aller Zellen der HPC-Mono-Kulturen (■, n=6) und Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.4.2 Co-Kultur

Der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an der gesamten Zellpopulation der Co-Kulturen stieg von initial 0,47 % (T0K) auf 1,24 % nach 18 h (T1K) bzw. auf 1,69 % nach insgesamt 42 h unter normoxischen Bedingungen (T2K; siehe Abb. 25).

Auch unter Hypoxie war die Apoptose-Rate signifikant erhöht und betrug nach 18 h (T1H) 1,5 %.

Unter normoxischen Bedingungen kam es durch EPO-Supplementierung zu einer tendenziellen Reduzierung der Apoptose-Rate mit 1,02 % nach 18 h (T1KE) und 1,45 % nach 42 h (T2KE). Besonders auffällig war, dass die Apoptose-Rate unter hypoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung (T1HE) mit 0,88 % tendenziell geringer war als im Korrelat ohne EPO-Supplementierung (T1H).

4.4.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur

Verglichen mit den Co-Kulturen lag die initiale Apoptose-Rate (T0K) bei den HDMEC-Mono-Kulturen signifikant höher (siehe Abb. 25). Die Hypoxie (T1H) schien einen vergleichbar negativen Einfluss auf die Apoptose-Rate in Mono- und Co-Kultur zu haben. Nach 42 h (T2K, T2KE) unter normoxischen Bedingungen war die Apoptose-Rate innerhalb der Co-Kulturen tendenziell höher als in den HDMEC-Mono-Kulturen. Interessanterweise führte die EPO-Supplementierung unter hypoxischen Bedingungen (T1HE) zu einer signifikanten Reduzierung der Apoptose-Rate innerhalb der Co-Kulturen im Vergleich zu den HDMEC-Mono-Kulturen.

Der Vergleich der Co-Kulturen mit den HPC-Mono-Kulturen zeigte deutlich, dass der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen in den HPC-Mono-Kulturen zu allen Zeiten außer T1H tendenziell höher war als in den Co-Kulturen (siehe Abb. 26). Die Co-Kultivierung führte folglich zu einer Reduzierung der Apoptose-Rate. Des Weiteren war die Apoptose-Rate unter normoxischen Bedingungen mit EPO-Supplementierung in Co-Kultur signifikant geringer als in der HPC-Mono-Kultur (T1KE).

4.5 Myofibroblastendifferenzierung

4.5.1 Humane Perizyten in Mono-Kultur

In der Mono-Kultur stieg der initiale Anteil α -SMA-positiver Perizyten von 31% (T0K) tendenziell auf 37 % nach 18 h (T1K) und verblieb bei 25 % nach 42 h unter normoxischen Bedingungen (T2K; siehe Abb. 27). Nach 18 h unter hypoxischen Bedingungen (T1H) lag der Anteil bei 39 %. Die EPO-Supplementierung zeigte mit 44 % nach 18 h Normoxie (T1KE) sowie mit 29 % nach 42 h Normoxie (T2KE) und mit 42 % nach 18 h Hypoxie (T1HE) keinen wesentlichen Unterschied zu den Kontrollen ohne EPO-Supplementierung (T1K, T2K, T1H).

4.5.2 Humane Perizyten in Co-Kultur

In Co-Kultur lag der initiale Anteil α -SMA-positiver Perizyten bei 40 % (T0K). Mit 57 % nach 18 h (T1K) und 50 % nach 42 h Normoxie (T2K) eine tendenzielle Erhöhung des Anteils über die Zeit zu sehen (siehe Abb. 27). Unter hypoxischen Bedingungen steigerte sich der Anteil im Bezug zum Anteil an T0K ebenfalls tendenziell auf 52 % nach 18 h (T1H). Die EPO-Supplementierung zeigte auch hier mit 64 % nach 18 h (T1KE) und mit 53 % nach 42 h Normoxie (T2KE) sowie mit 52 % nach 18 h Hypoxie (T1HE) keine wesentlichen Unterschiede zu den Korrelaten ohne EPO-Supplementierung (T1K, T2K, T1H).

4.5.3 Mono-Kultur vs. Co-Kultur

Auffällig war, dass der Anteil der α -SMA-positiven Perizyten an der gesamten HPC-Population innerhalb der Co-Kulturen von Beginn an tendenziell höher war, als in den Mono-Kulturen (siehe Abb. 27). Dieses Phänomen steigerte sich im Zeitverlauf, bis sich nach 42 h in Kontroll- und EPO-Gruppe (T2K, T2KE) ein signifikanter Unterschied zwischen Mono- und Co-Kultur zeigte.

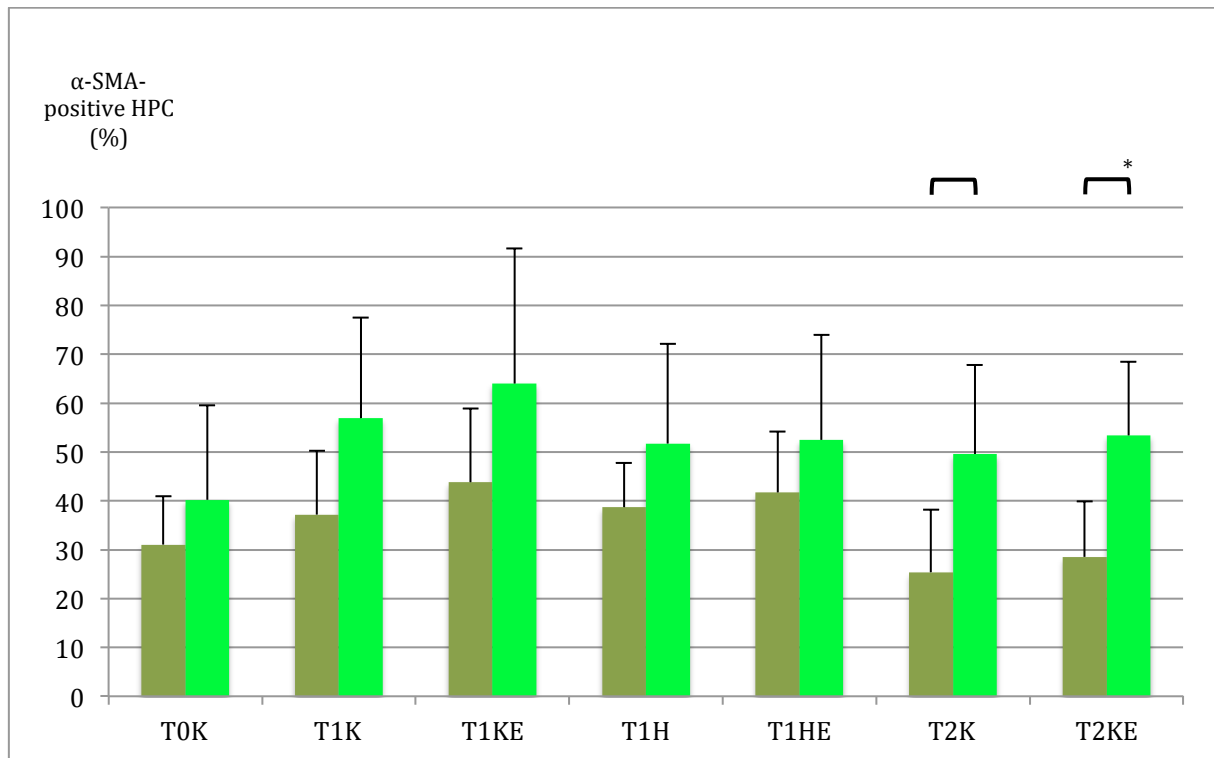


Abbildung 27: α -SMA-positive HPC-Population innerhalb der Mono- und Co-Kulturen

Anteil der α -SMA-positiven HPC in % an der gesamten HPC-Population der HPC-Mono-Kulturen (■, n=6) und der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=6) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p \leq 0,05.

4.6 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)

4.6.1 Mono-Kulturen

4.6.1.1 Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen

Die Menge von MCP-1 im Mediumüberstand der HDMEC-Mono-Kulturen stieg von initial 112 ng/10⁶ Zellen (T0K) auf 233 ng/10⁶ Zellen nach 42 h Normoxie (T2K) signifikant an (siehe Abb. 28). Hypoxie hatte keinen Einfluss auf die MCP-1-Ausschüttung. Die Kulturen mit EPO-Supplementierung zeigten nach 42h (T2KE) einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu T0K, der aber mit 189 ng/10⁶ Zellen tendenziell geringer war als bei der Gruppe ohne EPO-Supplementierung (T2K).

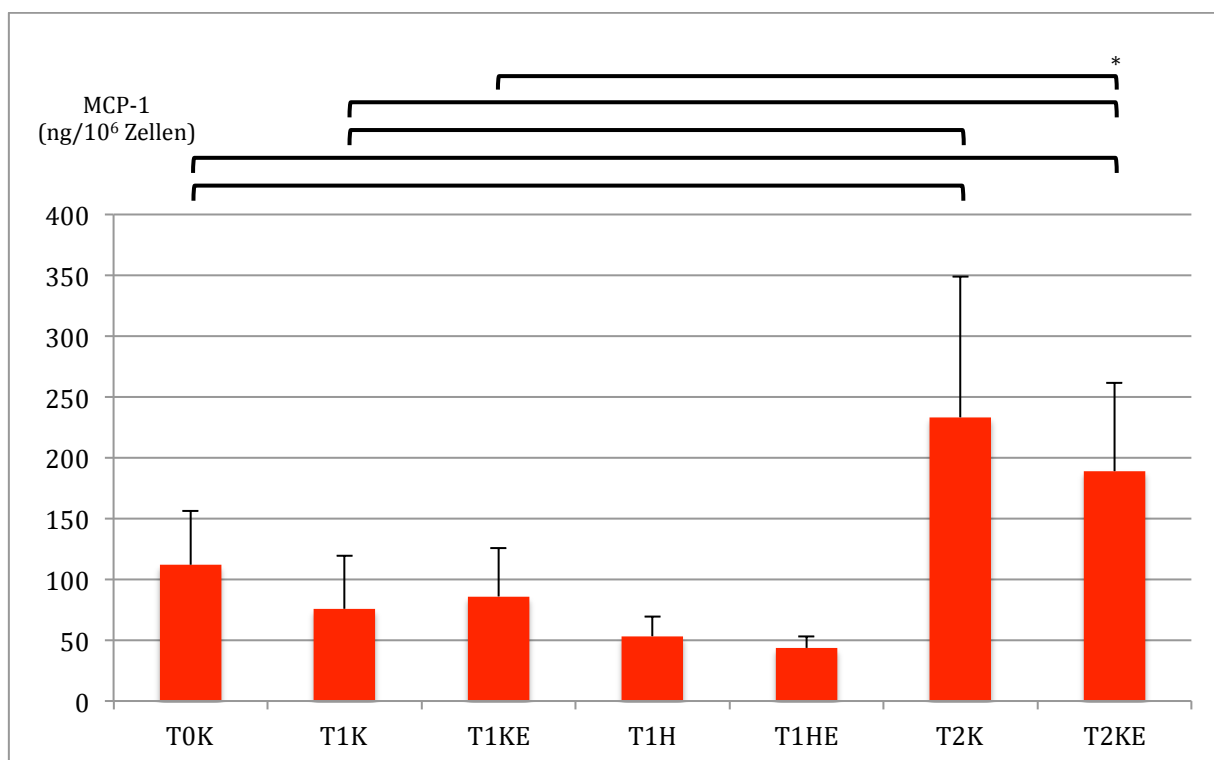


Abbildung 28: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) im Mediumüberstand der HDMEC-Mono-Kulturen

Menge an MCP-1 in ng pro 10⁶ Zellen der HDMEC-Mono-Kulturen (■, n=4) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.6.1.2 Humane Perizyten

Die MCP-1-Menge war innerhalb des Mediumüberstands der HPC-Mono-Kulturen insgesamt deutlich geringer als bei den HDMEC-Mono-Kulturen (siehe Abb. 29).

Der initiale MCP-1-Wert verringerte sich von 12 ng/10⁶ Zellen (T0K) zu allen Zeitpunkten signifikant. Es gab keinen Unterschied zwischen hypoxisch und normoxisch kultivierten Zellen (T1K vs. T1KE, T1H vs. T1HE) bzw. zwischen Kulturen mit EPO-Supplementierung (T1KE, T1HE, T2KE) und ihren jeweiligen Kontrollen (T1K, T1H, T2K).

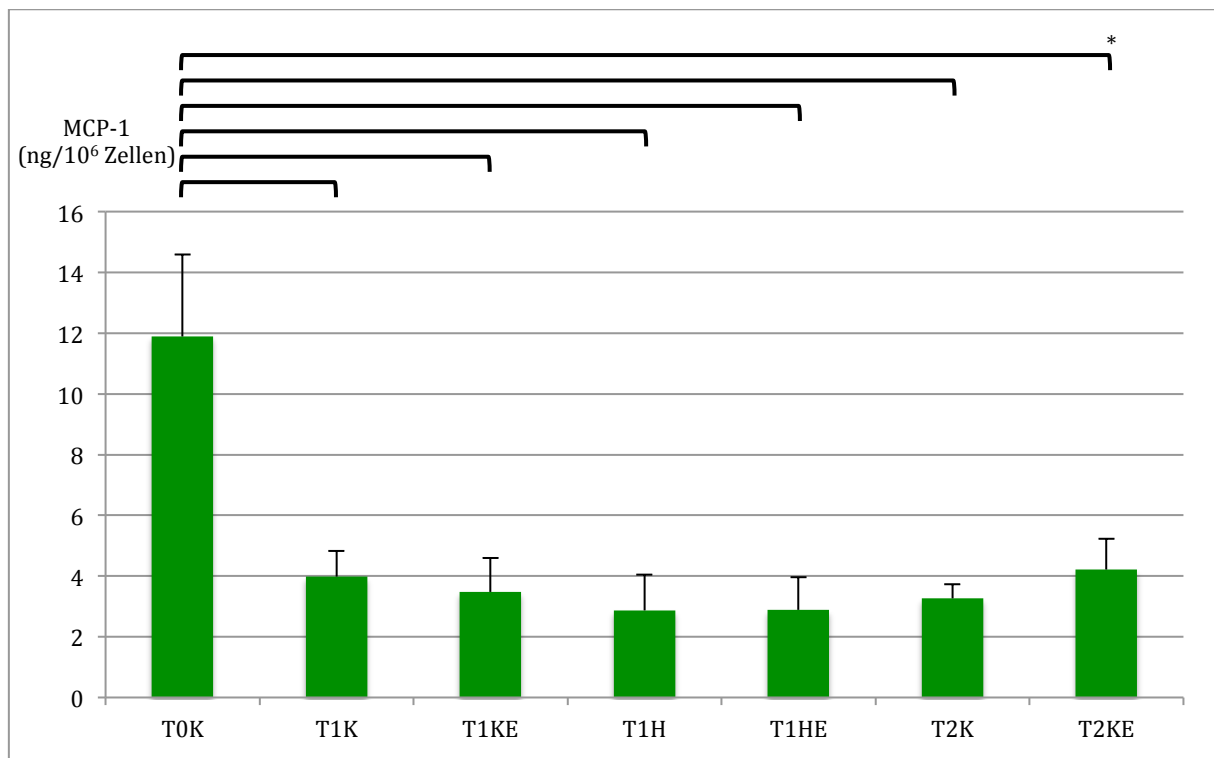


Abbildung 29: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) im Mediumüberstand der HPC-Mono-Kulturen

Menge an MCP-1 in ng pro 10⁶ Zellen der HPC-Mono-Kulturen (■, n=5) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.6.2 Co-Kultur

Die Menge von MCP-1 im Mediumüberstand stieg bei den Co-Kulturen von initial 197 ng/10⁶ Zellen (T0K) auf maximal 305 ng/10⁶ Zellen nach 42 h Normoxie (T2KE) signifikant an (siehe Abb. 30). Unter hypoxischen Bedingungen war mit 64 ng/10⁶ Zellen nach 18 h (T1H) eine signifikante Reduzierung der MCP-1-Ausschüttung im Vergleich zu T0K zu verzeichnen. Die EPO-Supplementierung führte unter hypoxischen Bedingungen (T1HE) ebenfalls zu signifikant reduzierten Werten im Vergleich zu T0K sowie im Vergleich zur normoxischen Kontrolle mit EPO-Supplementierung (T1KE).

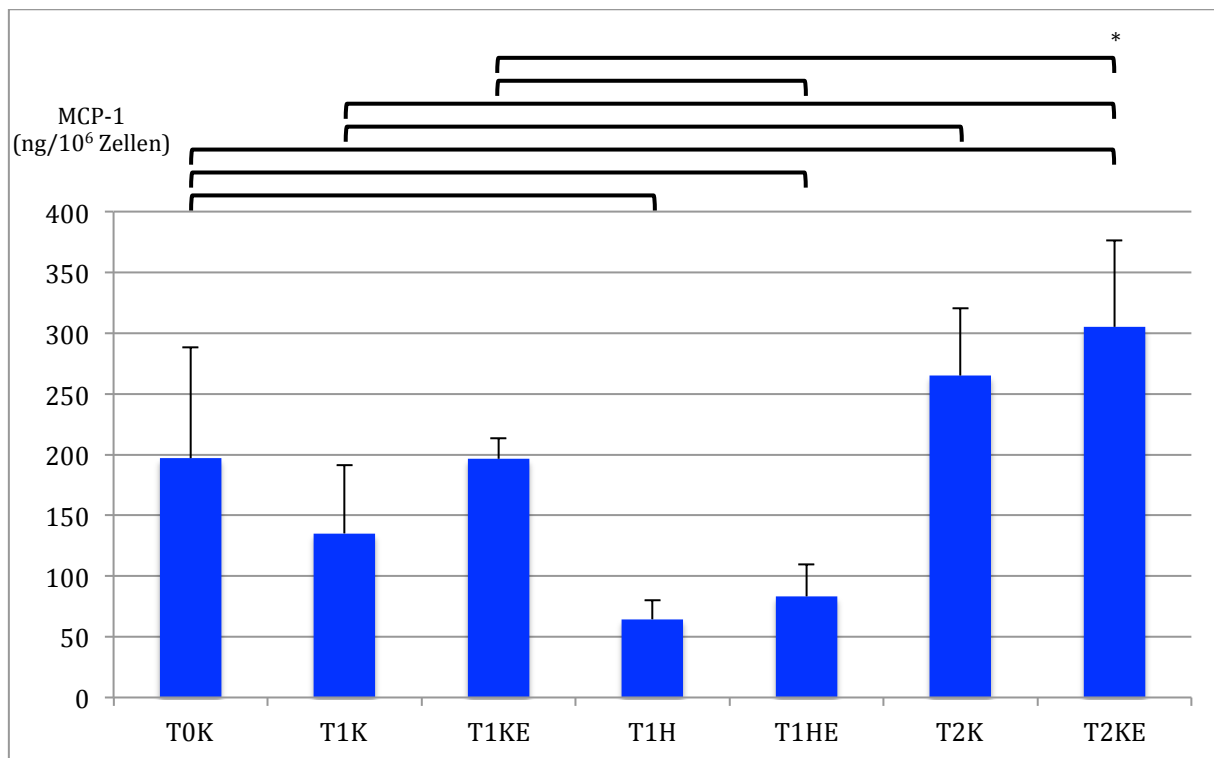


Abbildung 30: Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) im Mediumüberstand der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC

Menge an MCP-1 in ng pro 10⁶ Zellen der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC (■, n=4) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

4.7 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Die Menge an VEGF im Kulturmedium war innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen sowie innerhalb der Co-Kulturen aus HDMEC und HPC unter der Nachweisgrenze von 5 pg/ml. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Mediumüberstand der HPC-Mono-Kulturen eine geringe initiale VEGF-Menge von 1,3 ng/10⁶ Zellen (T0K) und eine tendenzielle Steigerung unter Hypoxie-Einfluss auf 2,7 ng/10⁶ Zellen (T1H) bzw. 3 ng/10⁶ Zellen mit EPO-Supplementierung (T1HE; siehe Abb. 31).

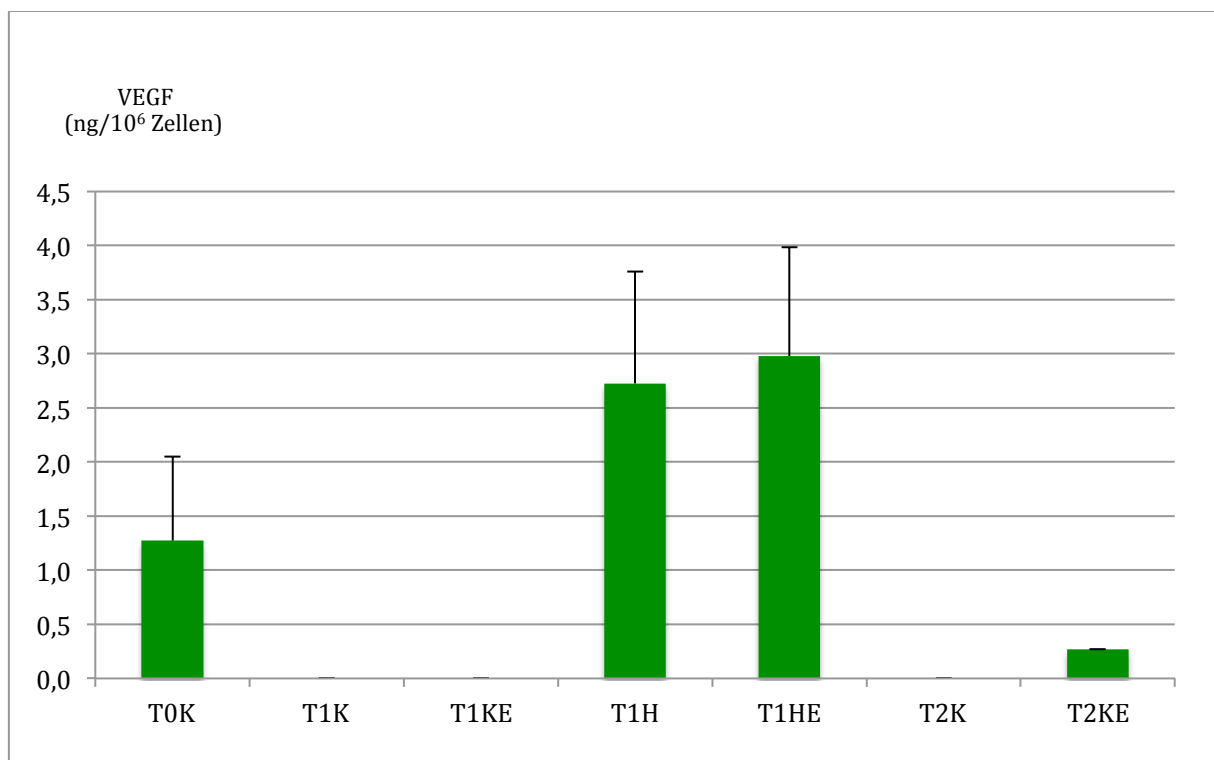


Abbildung 31: Vascular endothelial growth factor (VEGF) im Mediumüberstand der HPC-Mono-Kulturen

Menge an VEGF in ng pro 10⁶ Zellen der HPC-Mono-Kulturen (■, n=3) nach initial 0 h (T0K), nach 18 h Normoxie (T1K), nach 18 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T1KE), nach 18 h Hypoxie (T1H), nach 18 h Hypoxie mit EPO-Supplementierung (T1HE), nach 42 h Normoxie (T2K) und nach 42 h Normoxie mit EPO-Supplementierung (T2KE). Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung; *p ≤ 0,05.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Co-Kultivierung von HDMEC und HPC auf der Grundlage eines etablierten, standardisierten zweidimensionalen In-vitro-Wundheilungsassays, aus normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) und HDMEC. Durch die Anpassung dieses Assays war es in dieser Arbeit möglich, Zelleigenschaften und -Interaktion von HDMEC und HPC mit Hilfe verschiedener Auswerteparameter im Zeitverlauf und als Antwort auf Hypoxie und EPO-Gabe zu charakterisieren.

Im Folgenden sollen die wesentlichen methodischen Aspekte und die Ergebnisse diskutiert werden.

Methoden

Die Co-Kultivierung von Endothelzellen und Perizyten hat schon in der Vergangenheit gezeigt, dass die zelluläre Interaktion nicht nur durch verschiedene Metabolite, wie z.B. TGF- β 1, sondern auch durch den direkten Zellkontakt maßgeblich beeinflusst wird (Orlidge & D'Amore 1987; Antonelli-Orlidge et al. 1989). In der Literatur findet man zahlreiche Studien, die sich mit der Co-Kultivierung von Endothelzellen und Perizyten beschäftigten (Darland et al. 2003; Walshe et al. 2011; Waters et al. 2013). Der von uns modifizierte Co-Kultur-Assay (Oberringer et al. 2007) lässt die Untersuchung verschiedener Parameter wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose unter dem Einfluss der Variablen Hypoxie und EPO-Supplementierung simultan zu. Ebenso kann der Einfluss des direkten Zellkontaktes auf den Schluss eines in-vitro erzeugten Wundspalts erfasst werden (Migration). In diesem Zusammenhang befassen sich zwar zahlreiche Studien mit der Perizyten-Endothelzell-Interaktion vor dem Hintergrund der Weichteilheilung, jedoch basieren diese, im Gegensatz zur vorliegenden Studie zumeist auf Tiermodellen (Crocker et al. 1970) bzw. auf der Verwendung boviner Zellen (Sato & Rifkin 1989).

Um optimale Versuchsbedingungen zu erhalten, war es nötig, eine geeignete Zelldichte für die Beurteilung des In-vitro-Wundspalts unter Beibehaltung eines adäquaten Zell-Zell-Verhältnisses innerhalb der Versuchszeit von 42 h zu haben. Die Bestimmung der Zellzahl und des Verhältnisses der Zelltypen zueinander geschah einerseits auf der Basis vorangegangener Arbeiten (Oberringer et al. 2007; Oberringer et al. 2008; Schwarz et al. 2013; Aichele et al. 2013), andererseits mithilfe von Vorversuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden eine Dichte von annähernd 250 Zellen/mm² und ein Verhältnis von HDMEC:HPC von 2:1, angestrebt. Gelegentlich gestaltete es sich als schwierig, das für den Versuchsbeginn vorgesehene Zellzahlverhältnis zu erreichen, da sich die Zellen während der Expansion, also zwischen Ansetzen der Kryokulturen und eigentlichem Versuch, von Experiment zu Experiment unterschiedlich verhielten. Daher musste in einigen Fällen vom standardisierten Expansionsprotokoll geringfügig zeitlich abgewichen werden. Nach einem initialen HDMEC:HPC-Verhältnis von 3:1 stabilisierte sich das angestrebte Verhältnis auf ca. 2:1 über den weiteren Versuchsablauf.

Die Quantifizierung der Zellproliferation geschah in unserem Fall durch zwei verschiedene Parameter, nämlich die absolute Zellzahl nach fluoreszenzmikroskopischer Auswertung sowie die Anzahl der Zellen, die sich in einer der Zellzyklusphasen außerhalb der Ruhephase G₀ befanden.

In der Vergangenheit gab es bereits verschiedene Ansätze, In-vitro-Wunden zu erzeugen, z.B. mit Hilfe von Rasierklingen (Sato & Rifkin 1988), Haifischzahnkämme (Yin et al. 2008) oder Pipettenspitzen (Pan et al. 2011). In unserem Fall wurde der In-vitro-Wundspalt mithilfe von 1000 µl-Pipettenspitzen erzeugt, wobei sich die mittleren Werte für die initiale Spaltbreite zwischen 733 µm (Co-Kultur) und 1171 µm (HPC-Mono-Kultur) bewegten. Diese initialen Spaltbreiten gewährleisteten die korrekte Bestimmung des Spaltschlusses in Abhängigkeit der Zellproliferation auch noch nach 42 h.

Die Migration der Zellen stellt einen essentiellen Bestandteil der Weichteilheilung in vivo dar und bildet die Grundvoraussetzung für einen erfolgreichen Wundschluss (Scharffetter-Kochanek et al. 1994; Pollard & Borisy 2003). Die Migration ist ein sehr komplexer und schwer zu quantifizierender Parameter, abhängig von den untersuchten Zellen und ihrem Differenzierungsstadium sowie den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten (Friedl & Wolf 2010). Infolgedessen ist es nötig, die Versuchsmodelle den zu untersuchenden Zellen und ihrem erfahrungsgemäßen

Migrationsverhalten anzupassen bzw. ein Setting auszuwählen, welches die Kontrolle möglichst vieler Variablen zulässt. Es sind zahlreiche Methoden zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen beschrieben, wie beispielsweise die intravenöse Injektion von Zellsuspensionen mit anschließender Analyse der Weichteilpräparate (Abe et al. 2001). Außerdem werden die Boyden-Kammer sowie Mikrofluidik-Systeme zur Untersuchung der Zellmigration anhand von Konzentrationsgradienten bzw. innerhalb laminarer Strömungen verwendet (Wei et al. 2015). Trotz zahlreicher neuer Methoden ist die mikroskopische Quantifizierung der Zellmigration in einen in vitro erzeugten Wundspalt weiterhin gängige Praxis (Takata et al. 2011; Latifi-Pupovci et al. 2015). Neben der detaillierten Darstellung von Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Interaktionen (Liang et al. 2007) bieten diese Wundheilungsassays zunehmend bessere Möglichkeiten, den Zusammenhang zwischen Migration und Proliferation der Zellen zu charakterisieren (Maini et al. 2004; Johnston et al. 2014).

Das hier vorgestellte Versuchsmodell wird dem Anspruch gerecht, relevante Einflussfaktoren auf verschiedene, an der Weichteilheilung beteiligte Zelltypen, überprüfen zu können. In der vorliegenden Arbeit um die Komponente des humanen Perizyten ergänzt, zeigt sich insbesondere die generelle Ausbaufähigkeit des Modells zur Überprüfung weiterer für die Weichteilheilung maßgeblicher Faktoren, auch vor dem Hintergrund der Funktion des Perizyten im Rahmen der Angiogenese.

Die in dieser Studie untersuchten Parameter waren neben der Migration und der Proliferation die Apoptose-Rate und die α -SMA-Expression der Perizyten. Die Menge von MCP-1, als einem der wichtigsten Chemokine mit maßgeblicher Beteiligung an zahlreichen inflammatorischen Prozessen, wurde erfasst, ebenso die Menge von VEGF als wesentlichem Induktor der Angiogenese während der Weichteilheilung.

Diese analytischen Parameter konnten verlässlich bestimmt werden, sodass der Einfluss verschiedener Faktoren, die im Rahmen der Weichteilheilung eine Rolle spielen, untersucht werden konnten. Hierzu gehörten die Auswirkung der Hypoxie auf die an der Weichteilheilung beteiligten Zelltypen sowie der Effekt von EPO unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen.

Ergebnisse

Migration

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten einen signifikanten Spaltschluss der In-vitro-Wundspalte innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen unter allen normoxischen Bedingungen mit und ohne EPO-Supplementierung. Es zeigte sich insbesondere kein negativer Effekt von EPO auf die Migration der Zellen. Die Hypoxie zeigt sich in diesem Fall nicht als Trigger für die Migration. Hier kam es in dem von uns untersuchten Zeitintervall nicht zu einem signifikant gesteigerten Spaltschluss.

Bei den HPC-Mono-Kulturen kommt es erst zum späten Zeitpunkt im Versuchsablauf zu einem signifikanten Spaltschluss. Hypoxie hatte keinen deutlich sichtbaren Effekt auf den Wundschluss, sodass wir mit diesem Ansatz eine in der Literatur beschriebene Hypoxie-induzierte Migration der Perizyten nicht direkt bestätigen konnten (Gonul et al. 2002). Dort waren allerdings grundlegend andere Eingangsbedingungen, wie die Verwendung tierischer Zellen eines anderen Organsystems sowie eine durch Minderperfusion induzierte Hypoxie, gewählt worden, sodass die Unterschiede zu unserem Ergebnis darin begründet sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit war insbesondere unter hypoxischen Bedingungen und EPO-Supplementierung die Migration der HPC innerhalb der Co-Kultur nicht signifikant erniedrigt, was gegen einen negativen Effekt von EPO auf die Migration der HPC spricht. Ein potentiell migrationsfördernder Effekt von EPO zeigte sich bereits unter hypoxischen Bedingungen im Zusammenhang mit NHDF-Mono-Kulturen (Breit et al. 2011).

EPO scheint also die Migration bestimmter Zellen im Rahmen des hypoxischen Reizes zu verbessern und die Proliferation zu unterstützen. Dies könnte sich insbesondere im Zuge der im Rahmen der Weichteilheilung geforderten Angiogenese positiv auswirken, da eine Migration der Perizyten die Endothelzellproliferation erst ermöglicht (Dore-Duffy & La Manna 2007). Indessen scheint EPO durch seinen anti-apoptotischen Effekt die vorhandenen Endothelzellen und Perizyten zu schützen, sodass vorhandene Gefäßformationen nicht gefährdet und der Weg für die Gefäßneubildung geebnet werden kann. Es zeigten sich also insgesamt Hinweise auf eine potentielle gefäßstabilisierende Wirkung von EPO ohne Anzeichen eines negativen Begleiteffektes.

Die Co-Kultivierung zeigte einen signifikanten Spaltschluss auch unter hypoxischen Bedingungen. Dies könnte ein Hinweis auf die gesteigerte Migration sein, die in Folge der direkten zellulären Interaktion von HDMEC und HPC auftritt. Da die Proliferationsrate der Co-Kulturen im Gegensatz zu der innerhalb der Mono-Kulturen unter hypoxischen Bedingungen signifikant niedriger war, scheint die Ursache für die deutliche Verminderung der Spaltbreite eher in einer gesteigerten Migration als in einer gesteigerten Proliferation begründet zu sein.

Proliferation

Die Proliferation der Zellpopulationen über die Zeit war innerhalb der Co- und Mono-Kulturen ähnlich. Allerdings zeigte sich bei den HPC-Mono-Kulturen im Vergleich zu den Co-Kulturen ein signifikant höherer Anstieg der Proliferationsrate nach 42 h, sodass hier ein potenziell hemmender Effekt der Co-Kultur-Bedingungen auf die HPC-Population deutlich wurde. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich bei der HDMEC-Population nur unter hypoxischen Bedingungen, wo innerhalb der Co-Kulturen eine deutlich niedrigere Proliferationsrate zu verzeichnen war als in den Mono-Kulturen. Insgesamt zeigte sich eine tendenziell niedrigere Proliferationsrate der HDMEC innerhalb der Co-Kulturen.

Eine Hemmung der Endothelzellproliferation durch den direkten Zellkontakt mit Perizyten in vitro ist beschrieben (Orlidge & D'Amore 1987). In vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe zeigte sich ebenfalls der proliferationshemmende Effekt im Zuge der Co-Kultivierung von HDMEC mit normalen humanen dermalen Fibroblasten (NHDF) (Oberringer et al. 2007; Oberringer et al. 2008).

Aufgrund der Daten gehen wir davon aus, dass die Auswirkung der Zellinteraktion auf die Proliferation sowohl durch Mediatoren, als auch durch direkten Zellkontakt vermittelt wird. Es zeigte sich, dass die HDMEC-Proliferation innerhalb der Co-Kulturen unter physiologischen Bedingungen generell dem hemmenden Einfluss der Perizyten unterworfen ist. Wir konnten im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Tarallo et al. 2012) keinen proliferationsfördernden Effekt der Co-Kultivierung darstellen, obwohl wir ebenfalls humane, nicht immortalisierte Zellen verwendeten. Allerdings könnte der entscheidende Unterschied in der Trennung der beiden Zelltypen durch eine permeable Membran während der Co-Kultivierung liegen, der einen direkten Zellkontakt

verhindert (Tarallo et al. 2012). Der hemmende Einfluss der Perizyten auf die Endothelzellproliferation durch beispielsweise TGF- β 1 wurde in der Vergangenheit bereits nachgewiesen (Sankar et al. 1996). Die Aktivierung bestimmter Mediatoren wie z.B. TGF- β 1 wird allerdings auch durch den direkten Zellkontakt beeinflusst, da hierbei u.a. Enzyme der Zelloberfläche eine wesentliche Rolle spielen können (Takamura et al. 2008). Die gegenseitige Inhibition der Proliferation spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen unserer Zellzyklusanalysen wider, in denen die Rate der Zellen, die sich außerhalb der Zellzyklus-Ruhephase G₀ befanden, innerhalb der Co-Kulturen bei beiden Zelltypen tendenziell geringer war.

Die EPO-Supplementierung zeigte im Zusammenhang mit der Proliferation der Zellen einen tendenziell proliferationsfördernden Effekt innerhalb beider Mono-Kulturen sowie keinen negativen Effekt innerhalb der Co-Kulturen. Insbesondere im Bezug zu Endothelzellen ist der proliferationsfördernde und neoangiogene Effekt von EPO in der Literatur beschrieben (Ribatti et al. 1999; Jaquet et al. 2002).

Apoptose

Apoptose ist ein wesentlicher Bestandteil der physiologischen Weichteilheilung und kann bei Fehlregulation zahlreiche pathophysiologische Prozesse zur Folge haben (Desmoulière et al. 1995; Hinz 2007).

Unsere Ergebnisse zeigten bereits zu Versuchsbeginn einen signifikant höheren Anteil apoptotischer Zellen innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen im Vergleich zu den Co-Kulturen, der allerdings im weiteren Verlauf, im Gegensatz zu den Co-Kulturen, keine signifikante Steigerung erfuhr.

Innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen könnte der initial höhere Anteil apoptotischer Zellen im Fehlen von essentiellen Zell-Kontakten und Komponenten der ECM begründet sein, wobei die Steigerung der Apoptose-Rate im Zeitverlauf innerhalb der Co-Kulturen eher für einen Mangel an anti-apoptotisch wirksamen Wachstumsfaktoren innerhalb des Kulturmilieus sprechen könnte (Chavakis & Dimmeler 2002).

In vorausgegangenen Arbeiten mit einem ähnlichen Modell konnte ebenfalls eine initial niedrigere Apoptose-Rate innerhalb von Co-Kulturen aus HDMEC und NHDF festgestellt werden (Aichele et al. 2013).

Die Apoptose-Rate war bei den Co-Kulturen unter Hypoxie nicht signifikant verändert. Innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen unter Hypoxie und zusätzlicher EPO-Supplementierung war die Apoptose-Rate signifikant niedriger als in der entsprechenden Co-Kultur. Dies kann als weitere Bestätigung des anti-apoptotischen Effekts von EPO, der in der Literatur beschrieben wird (Fisher 2003), gesehen werden.

Bezüglich eines möglichen Mechanismus', der zu diesem anti-apoptotischen Effekt von EPO innerhalb der Co-Kulturen führt, wird u.a. beschrieben, dass die Wirkung von EPO auf indirektem Weg erfolgen kann, indem durch inflammatorische Prozesse die Expression der EPO-Rezeptoren hochreguliert wird, anstatt dass es zu einer direkten Hemmung über einzelne Wachstumsfaktoren kommt (Villa et al. 2003).

Die Apoptose-Rate war unter EPO-Supplementierung innerhalb der Co-Kulturen nach 18 h Normoxie im Vergleich zu den HPC-Mono-Kulturen signifikant reduziert. In diesem Zusammenhang haben einige Studien gezeigt, dass EPO außer anti-oxidativen Effekten u.a. auch einen, speziell Perizyten betreffenden, anti-apoptotischen Effekt durch Reduzierung der Angiopoietin-2-Überproduktion haben könnte (Wang et al. 2010; Khairoun et al. 2013).

Hypoxie zeigte generell einen stärkeren negativeren Effekt auf die Zellen in Co-Kultur. Folglich wird unter Co-Kulturbedingungen auch der anti-apoptotische Effekt von EPO deutlicher. Die EPO-Supplementierung zeigte bei den HPC-Mono-Kulturen signifikante Unterschiede zur Co-Kultur. Hier konnte der anti-apoptotische Effekt von EPO auf die Co-Kultur unter normoxischen Bedingungen im Vergleich zur HPC-Mono-Kultur dargestellt werden. Allerdings konnte der anti-apoptotische Effekt von EPO auf die HPC-Mono-Kulturen ebenfalls deutlich gemacht werden, da im Vergleich zur Normoxie eine signifikant niedrigere Apoptose-Rate unter hypoxischen Bedingungen sichtbar wurde.

Es wird beschrieben, dass der anti-apoptotische Einfluss von EPO über zahlreiche Signalkaskaden unter Beteiligung von Wachstumsfaktoren wie z.B. auch Angiopoietin-2 reguliert wird und eine Fehlregulation zur Destabilisierung neu angelegter Gefäße führen kann (Stratman et al. 2009; Wang et al. 2010). Angiopoietin-2 führt als Gegenspieler von Angiopoietin-1 zur erhöhten Permeabilität und vaskulären Inflamationsprozessen (Wang et al. 2010; Khairoun et al. 2013). Dieser Zusammenhang kann von Bedeutung sein, da Hypoxie als einer der maßgeblichen Stimuli der Angiogenese u.a. auch zu einer Überexpression von pro-angiogenen Faktoren wie Angiopoietin-2 und VEGF durch Endothelzellen führen kann (Pichiule et al. 2004).

Expression von α -SMA bei Perizyten

Perizyten zeichnen sich durch kontraktile Eigenschaften aus (Sims 1986) und sind mit Hilfe bestimmter Aktin-Isoformen in der Lage, die kapilläre Permeabilität sowie den Blutfluss zu regulieren (Herman & D'Amore 1985). Das von uns genutzte α -SMA wird seit einiger Zeit als für diese Eigenschaften maßgebliche Isoform des Aktins beschrieben (Skalli et al. 1989).

Es zeigte sich in unserer Arbeit, dass der Anteil der α -SMA-positiven Perizyten innerhalb der Mono-Kulturen mit initial 31 % an der gesamten Perizytenpopulation bereits zu Versuchsbeginn generell geringer war, als der Anteil der α -SMA-positiven Perizyten innerhalb der Perizytenpopulation der Co-Kulturen mit 40 %. Perizyten innerhalb der Co-Kulturen zeigten zu jedem Zeitpunkt eine höhere Rate an α -SMA-positiven Zellen als in den entsprechenden Mono-Kulturen mit signifikanten Unterschieden nach 42 h. Es konnte mit diesem Modell in vitro also gezeigt werden, dass die Co-Kultivierung mit HDMEC die Differenzierung der HPC in einen α -SMA-positiven, Myofibroblasten-ähnlichen Subtyp induziert bzw. die Persistenz dieses Subtyps unterstützt.

Diese Ergebnisse kann man direkt in Bezug zur gesteigerten Myofibroblasten-Differenzierung in vivo während der Weichteilheilung setzen. Neben Perizyten neigen insbesondere Fibroblasten zur Differenzierung in einen α -SMA-exprimierenden Zelltyp (Gabbiani 2003; Smith et al. 2014).

In vorangegangenen Arbeiten war bereits in vitro eine signifikant höhere Rate an Myofibroblasten bei chronischen Wunden im Vergleich zu regulär abheilenden Wunden nachgewiesen worden (Schwarz et al. 2013). Ebenso konnte eine Hypoxie-induzierte Zunahme des Myofibroblasten-Anteils der Fibroblastenpopulation in Mono- und Co-Kulturen mit HDMEC dargestellt werden (Breit et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz dazu keine Hypoxie-induzierte Differenzierung der Perizyten in einen α -SMA-exprimierenden Zelltyp nachgewiesen werden. Dies weist deutlich auf die verschiedenen Rollen hin, die Fibroblasten und Perizyten während der Weichteilheilung spielen. Da anhand unserer Ergebnisse keine deutlich gesteigerte Differenzierung der Perizyten in einen α -SMA-exprimierenden Zelltyp unter Hypoxie zu sehen war, bestätigt dies die Hypothese, dass Perizyten als gefäßmodulierende Zellen in bestimmten Phasen der physiologischen Weichteilheilung Hypoxie-induziert auch zu einer Gefäßrelaxierung bzw. Gefäßdilatation führen können

(Tilton et al. 1979; Kramann & Humphreys 2014), um dadurch der Minderperfusion des Gewebes entgegen zu wirken.

Die EPO-Supplementierung zeigte in diesem Setup keine deutliche Wirkung auf die Differenzierung der Perizyten in einen α -SMA-exprimierenden Subtyp.

Monocyte chemoattractant protein-1

Unsere Ergebnisse zeigen, dass beide Zelltypen in vitro generell zur MCP-1-Ausschüttung befähigt sind, wobei die Ausschüttung bei HDMEC höher ist, als bei HPC (Dohgu & Banks 2013). HPC zeigten die höchste Ausschüttung initial, während HDMEC die Ausschüttung im Zeitverlauf steigerten. In diesem Versuchsmodell lag die MCP-1-Ausschüttung als Reaktion auf den direkten Zellkontakt beider Zelltypen im Fokus der Untersuchungen: Bei Co-Kultivierung von HDMEC und HPC war die MCP-1-Ausschüttung zu jedem Untersuchungszeitpunkt tendenziell höher als in den entsprechenden Mono-Kulturen. Diese gesteigerte MCP-1-Ausschüttung in den Co-Kulturen ist ein charakteristisches Merkmal des Versuchsmodells und bildet möglicherweise das In-vitro-Korrelat zur In-vivo-Situation der Zellen innerhalb einer stabilen Gefäßwand, die sich durch den direkten Zell-Kontakt zwischen Perizyten und Endothelzellen auszeichnet. Die Literatur zeigt, dass MCP-1 nicht nur an Inflammations- und Fibrosierungsprozessen beteiligt ist (Xueyong et al. 2008; Baeck et al. 2012; Yao & Tsirka 2014), sondern auch eine wesentliche Rolle in der physiologischen Kommunikation zwischen Endothelzellen und Perizyten einnimmt: MCP-1 scheint speziell die tight junctions zwischen Endothelzellen und Perizyten zu beeinflussen und so u.a. die vaskuläre Permeabilität zu steuern (Yao & Tsirka 2014).

Hypoxie führte im Versuchsmodell zu einer tendenziellen, nicht signifikanten Verminderung der MCP-1-Ausschüttung innerhalb der HDMEC- und der Co-Kulturen. Zusätzlich verminderte Hypoxie die MCP-1-Ausschüttung der Co-Kulturen signifikant unter EPO-Supplementierung. Dies stellt einen weiteren Hinweis auf einen die MCP-1-Ausschüttung reduzierenden Effekt von EPO dar, wie er bereits in vivo beschrieben ist (Nishiya et al. 2006). In vivo könnte die Reduzierung der MCP-1-Ausschüttung unter Hypoxie, unterstützt durch EPO, die Angiogenese und nachfolgende Gefäßstabilisierung in Folge eines Weichteilschadens ermöglichen. In diesem Fall müssen die Perizyten von

den Gefäßen weg migrieren, um die Endothelzellproliferation zu ermöglichen (Dore-Duffy 2008). Dies wird u.a. durch die niedrigen MCP-1-Werte ermöglicht, die, wie in der Literatur beschrieben, als Reaktion auf Hypoxie während der physiologischen Weichteilheilung auftreten (Chen et al. 2013). In diesem Kontext ist es im Bezug zur In-vivo-Situation vorstellbar, dass EPO zusätzlich die Migration der Perizyten weg von ihrem vaskulären Standort fördert, was die verstärkte Proliferation der Endothelzellen und somit die Bildung neuer Gefäße zulässt. Die Bildung neuer Gefäße wird auch unter dem Einfluss pathologischer Stimuli, durch den die Perizyten ihre bisherige perivaskuläre Lokalisation verlassen, ermöglicht (Dore-Duffy et al. 2000).

Wir beobachteten im Zusammenhang mit erhöhter MCP-1-Ausschüttung keine erhöhten Migrationsraten bei den HPC, was dafür spricht, dass die Perizyten ihre perivaskuläre Lokalisation eher unter dem Einfluss niedriger MCP-1-Werte verlassen und von den Gefäßen weg migrieren. Dies würde sich mit der Literatur insofern decken, als dass die Perizyten bei erhöhten MCP-1-Werten in Richtung der Gefäße migrieren (Ma et al. 2007). Bereits in vorangegangenen Arbeiten konnte eine erhöhte MCP-1-Ausschüttung, insbesondere bei Fibroblasten aus chronischen Wunden, innerhalb von Co-Kulturen mit HDMEC festgestellt werden (Schwarz et al. 2013). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass erhöhte MCP-1-Werte in der chronischen Wunde die Endothelzellproliferation verhindern, da die Perizyten unter dem Einfluss von hohen MCP-1-Werten nicht vom Gefäß weg migrieren.

Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Der Wachstumsfaktor VEGF als einer der wichtigsten Induktoren der Angiogenese (Romano Di Peppe et al. 2002) wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht, um die Auswirkung der Versuchsparameter auf angiogene Prozesse zu testen.

Es ist bekannt, dass die Genexpression von *VEGF* bei zahlreichen Zelltypen aufgrund von pro-inflammatorischen Reizen oder Hypoxie u.a. durch den hypoxia-inducible-factor (HIF) hochreguliert wird (Jozkowicz et al. 2002; Watanabe et al. 2005). Es zeigte sich, dass Hypoxie in Folge eines Weichteilschadens die Proliferation von HDMEC induzieren kann (Steinbrech et al. 1999). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass HDMEC in vivo

und in vitro besonders durch den Einfluss von Hypoxie zur Ausschüttung von VEGF angeregt werden (Detmar et al. 1997).

Die in dieser Arbeit gemessene VEGF-Menge im Mediumüberstand war innerhalb der HDMEC-Mono-Kulturen sowie der Co-Kulturen unterhalb der Test-Nachweisgrenze von 5 pg/ml. Wir konnten somit in dieser Studie die in vorangegangenen Arbeiten nachgewiesene VEGF-Ausschüttung der HDMEC in Mono- und Co-Kultur mit NHDF nicht reproduzieren (Breit et al. 2011), was möglicherweise auch in der Verwendung einer anderen Charge von HDMEC als in den vorangegangenen Arbeiten begründet sein könnte. Im Weiteren wurde in vorangegangenen Arbeiten zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren im Kulturmedium-Überstand ein Cytometric Bead Array verwendet, der möglicherweise aufgrund einer höheren Sensitivität abweichende Ergebnisse lieferte (Bomert 2013).

Wir konnten allerdings innerhalb der HPC-Mono-Kulturen unter dem Einfluss der Hypoxie mit und auch ohne EPO-Supplementierung einen tendenziellen Anstieg der VEGF-Ausschüttung beobachten. Dies bestätigt einerseits die von Perizyten bekannte Ausschüttung von VEGF innerhalb früher Phasen der Angiogenese (Darland et al. 2003), andererseits demonstriert es die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase durch Synthese und Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren durch die Perizyten insbesondere infolge negativer Stimuli wie niedriger Sauerstoffkonzentration im Gewebe (Dore-Duffy et al. 2005).

Es zeigte sich bei den HPC ein ähnliches Ausschüttungsprofil des VEGF im Zeitverlauf wie bei mono-kultivierten NHDF in vorangegangenen Arbeiten, bei denen ebenfalls ein tendenzieller Anstieg unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden konnte (Breit et al. 2011). Jedoch zeigte sich in der aktuellen Studie eine tendenziell stärkere Ausschüttung unter Hypoxie und gleichzeitiger EPO-Supplementierung bei den HPC, was bei den NHDF nicht der Fall zu sein schien. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass beide Zelltypen zur Ausschüttung von VEGF befähigt sind und unter Hypoxie ein ähnliches Verhalten zeigen, jedoch unterschiedlich auf die EPO-Supplementierung reagieren.

In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass die durch Hypoxie verursachte Ausschüttung von VEGF sich mit der Tatsache vereinbaren lässt, dass Perizyten von den Gefäßen weg migrieren und es so zu einer Destabilisierung der Gefäße und infolgedessen zur Angiogenese kommt (Greenberg et al. 2008).

Schlußfolgerung und Perspektive

Da die Interaktion von Endothelzellen und Perizyten mit direktem Zellkontakt zueinander in vitro in einem gewissen Rahmen eine stabile Gefäßsituation vor dem Hintergrund der Weichteilheilung in vivo widerspiegelt, können auf Basis der vorliegenden Ergebnisse auch Aspekte der Angiogenese diskutiert werden (siehe Abb. 32): Unter physiologischen Bedingungen tragen beide Zelltypen gemeinsam zur Stabilität der Gefäße bei. Als Reaktion auf Gewebetraumata und die damit einhergehende Schädigung der Gefäße ist der Sauerstoffgehalt innerhalb des Gewebes zu Beginn der Weichteilheilung stark vermindert. Aufgrund unserer Ergebnisse ist anzunehmen, dass die aus dem Weichteilschaden resultierende Hypoxie zur verminderten Ausschüttung von MCP-1 führt. Dadurch lösen sich die interzellulären Verbindungen zwischen Perizyten und Endothelzellen, was die Migration der Perizyten von ihrer perivaskulären Lokalisation und in der Folge die Endothelzellproliferation ermöglicht. Perizyten unterstützen außerdem die weitere Weichteilheilung über ihren Beitrag zur Wundkontraktion und über die Synthese von ECM-Komponenten, insbesondere durch ihren α -SMA-positiven, Myofibroblasten-ähnlichen Subtypen (Paquet-Fifield et al. 2009; Dulmovits & Herman 2012).

Unser Versuchsmodell erbrachte den Nachweis, dass unter Hypoxie eher die Migration und nicht die Proliferation der Perizyten stattfindet. Dies wurde anhand des erhöhten Anteils der Perizyten, die sich unter Hypoxie innerhalb der G₀-Phase befanden, deutlich. Es erscheint möglich, dass Perizyten die Stabilisierung neuer Gefäße unterstützen. Wir gehen davon aus, dass vornehmlich α -SMA-negative Perizyten den proliferierenden Zellanteil bilden, da sich erkennen ließ, dass die Zellen innerhalb der Mono-Kulturen bei einem geringerem Anteil von α -SMA-positiven Perizyten besser proliferierten als in den Co-Kulturen mit einem höheren Anteil dieser Zellen. Aus dem Versuchsmodell konnte eine für die Weichteilheilung eher vorteilhafte Rolle von EPO abgeleitet werden. EPO verbesserte tendenziell die Proliferation der Perizyten innerhalb der Co-Kulturen unter dem Einfluss der Hypoxie und verminderte gleichzeitig die MCP-1-Ausschüttung. Ein negativer Effekt von EPO auf die Migration der Perizyten konnte dabei nicht festgestellt werden.

Es wird davon ausgegangen, dass es, um die Weichteilheilung regelrecht abschließen zu können, erforderlich ist, dass die Myofibroblasten-ähnlichen Perizyten über Apoptose reduziert werden (Desmoulière et al. 2005). Dies könnte u.a. durch niedrige MCP-1-

Werte unterstützt werden: Diesbezüglich hatte sich in vorangegangenen Arbeiten mit Fibroblasten bereits gezeigt, dass die MCP-1-Ausschüttung innerhalb chronischer Wunden erhöht ist, und dort möglicherweise die essentielle Apoptose der Myofibroblasten (Moulin et al. 2004; Desmoulière et al. 2005) verhindert. Die Wiederherstellung des physiologischen MCP-1-Niveaus und der normoxischen Bedingungen ist Grundvoraussetzung für die Stabilität der neu formierten Blutgefäße im Rahmen des regelrechten Abschlusses der Weichteilheilung.

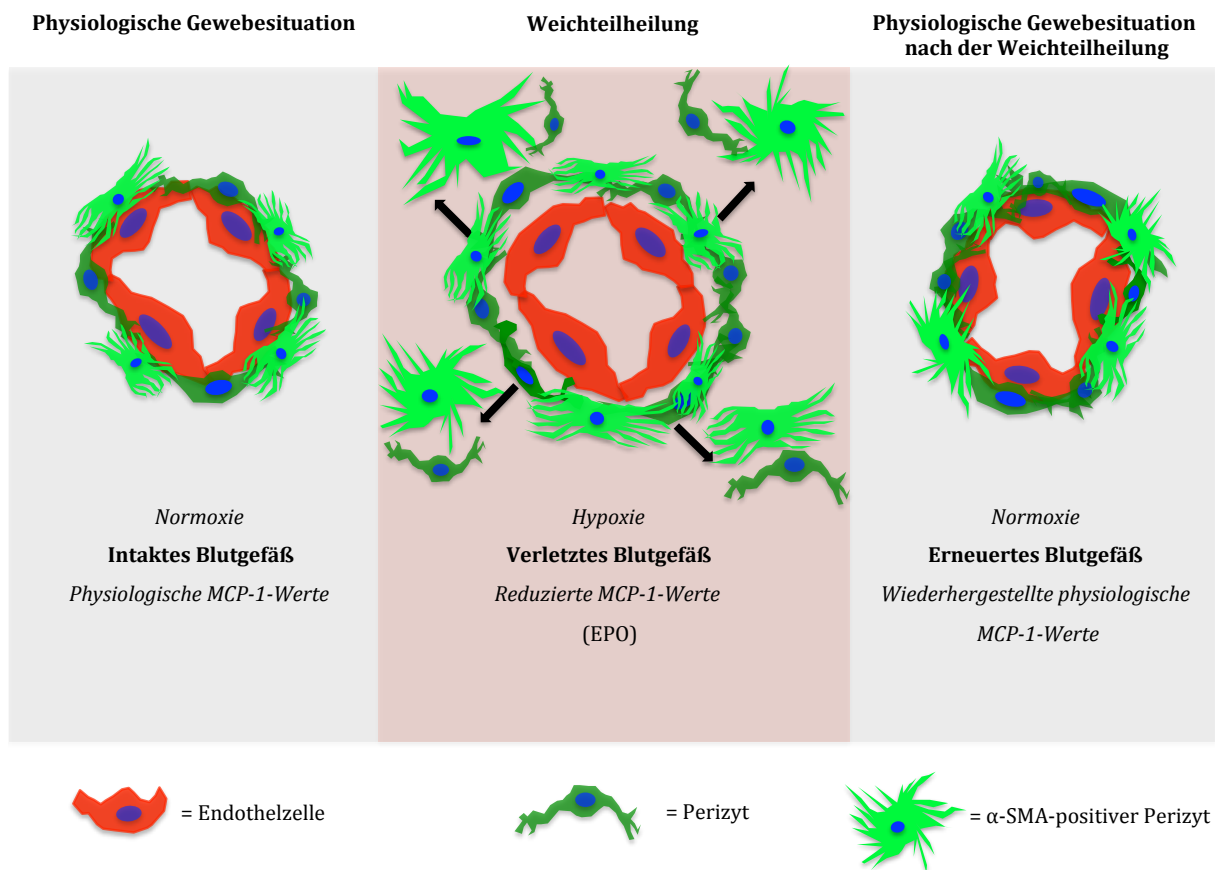


Abbildung 32: Modell für die zelluläre Interaktion von Endothelzellen und Perizyten während der Weichteilheilung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Co-Kultivierung von humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen und humanen Perizyten nicht nur generell möglich ist, sondern auch differenzierte Ergebnisse bezüglich des Verhaltens der Zellen in Mono-Kultur und Co-Kultur zulässt.

Unterschiedliche Aspekte der Interaktion der beiden Zelltypen durch direkten Zellkontakt und parakrin durch Wachstumsfaktoren sowie ihre Reaktion auf physiologische und pathophysiologische Faktoren können mit Hilfe des Versuchsmodells dargestellt werden.

Durch Anpassung des Versuchssetups ist es möglich, eine Näherung an die In-vivo-Situation innerhalb der Weichteilheilung zu erreichen. Insbesondere in Bezug auf die Untersuchung der Zellinteraktion zwischen Endothelzellen und Perizyten ist es von Vorteil, das Zell-Zell-Verhältnis organ- bzw. gewebspezifisch untersuchen zu können, da dieses einen maßgeblichen Faktor der zellulären Wechselwirkung darstellt (Shepro & Morel 1993). Im Weiteren werden für die Weichteilheilung maßgebliche Faktoren, wie Proliferation, Migration und Differenzierung simultan erfasst und können in Abhängigkeit physiologischer und pathophysiologischer Faktoren wie Hypoxie oder Arzneimittel-Zusatz untersucht werden. Durch die Bestimmung der Apoptose-Rate kann ein mögliches zelltoxisches Potenzial der Einflussfaktoren erfasst werden. Ergänzt wird dies durch die Messung mehrerer an der zellulären Interaktion beteiligter Wachstumsfaktoren innerhalb des Mediumüberstands.

Einzelne Ergebnisse dieser In-vitro-Untersuchungen sind dann auf die In-vivo-Situation übertragbar.

Das verwendete Versuchsmodell bietet zukünftig also die Möglichkeit der Variation und Erweiterung der Komponenten zur Charakterisierung diverser Zelltypen oder Arzneimittelnzusätze, die mit der Weichteilheilung assoziiert sind. So kann das Modell die Grundlage zur Erstellung neuer pharmakologischer Ansätze und Therapiekonzepte bilden und zur Entwicklung von neuen Behandlungsmöglichkeiten vor dem Hintergrund der pathologisch veränderten Weichteilheilung beitragen. Ebenso ist das Modell grundlegend geeignet, detaillierte Fragestellungen aus dem Kontext der Angiogenese in vitro zu bearbeiten.

6. Anhang

Literaturverzeichnis

1. Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN (2001) Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *The Journal of Immunology* 166:7556-7562
2. Aichele K, Bubel M, Deubel G, Pohlemann T, Oberringer M (2013) Bromelain down-regulates myofibroblast differentiation in an in vitro wound healing assay. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386:853-863
3. Akasaka Y, Ono I, Yamashita T, Jimbow K, Ishii T (2004) Basic fibroblast growth factor promotes apoptosis and suppresses granulation tissue formation in acute incisional wounds. *Journal of Pathology* 203:710-720
4. Andrews KL, Houdek MT, Kiemele LJ (2015) Wound management of chronic diabetic foot ulcers: from the basics to regenerative medicine. *Prosthetics and Orthotics International* 39:29-39
5. Antonelli-Orlidge A, Saunders KB, Smith SR, D'Amore PA (1989) An activated form of transforming growth factor- β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Cell Biology* 86: 4544-4548
6. Arnoldi R, Hiltbrunner A, Dugina V, Tille JC, Chaponnier C (2013) Smooth muscle actin isoforms: a tug of war between contraction and compliance. *European Journal of Cell Biology* 92:187-200
7. Baeck C, Wehr A, Karlmark KR, Heymann F, Vucur M, Gassler N, Huss S, Klussmann S, Eulberg D, Luedde T, Trautwein C, Tacke F (2012) Pharmacological inhibition of the chemokine CCL2 (MCP-1) diminishes liver macrophage infiltration and steatohepatitis in chronic hepatic injury. *Gut* 61:416-426
8. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM (2008) Wound healing dressings and drug delivery systems: a Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 97:2892-2923
9. Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W, Paus R (2007) Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *The FASEB Journal* 21:3346-3354
10. Bomert M (2013) Methodenvergleich zur Messung von Zytokinen im Rahmen großer epidemiologischer Studien. Dissertation, Philipps-Universität, Institut für

11. Bowler PG (2002) Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Wound healing and infections* 34:419-427
12. Boyapati L, Wang HL (2007) The role of stress in periodontal disease and wound healing. *Periodontology* 2000 44:195–210
13. Breit S, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M (2011) Erythropoietin ameliorates the reduced migration of human fibroblasts during in vitro hypoxia. *Journal of Physiology and Biochemistry* 67:1-13
14. Calderon M, Lawrence T, Banes AJ (1996) Increased proliferation in keloid fibroblasts wounded in vitro. *Journal of Surgical Research* 61:343-347
15. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9:653-660
16. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992) Monoclonal antibodies against recombinant parts of the ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *Journal of Pathology* 168:357-363
17. Chandan K (2009) Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen.* 17:1-18
18. Chavakis E, Dimmeler S (2002) Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 22:887-893
19. Chen CW, Okada M, Proto JD, Gao X, Sekiya N, Beckman SA, Corselli M, Crisan M, Saparov A, Tobita K, Péault B, Huard J (2013) Human pericytes for ischemic heart repair. *Stem Cells* 31:305-316
20. Chen WJ, He DS, Tang RX, Ren FH, Chen G (2015) Ki-67 is a valuable prognostic factor in gliomas: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16:411-420
21. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt A, Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527-3561
22. Clark, RAF (1985) Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. *Journal of the American Academy of Dermatology* 13:701-725

23. Clark RAF, Ghosh K, Tonnesen MG (2007) Tissue engineering for cutaneous wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 127:1018-1029
24. Cook-Mills JM, Deem TL (2005) Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 77:487-495
25. Coussens LM, Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420:860-867
26. Crocker DJ, Murad TM, Geer JC (1970) Role of the pericyte in wound healing - an ultrastructural study. *Experimental and Molecular Pathology* 13:51-65
27. Darby IA, Bisucci T, Pittet B, Garbin S, Gabbiani G, Desmoulière A (2002) Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. *Journal of Pathology* 197:117-127
28. Darland DC, Massingham LJ, Smith SR, Piek E, Saint-Geniez M, D'Amore PA (2003) Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Developmental Biology* 264:275-288
29. Das A, McGuire PG, Rangasamy S (2015) Diabetic macular edema: pathophysiology and novel therapeutic targets. *Ophthalmology* 122:1375-1394
30. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM (2013) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. *Adv Skin Wound Care* 25:304-314
31. Demidova-Rice TN, Hamblin MR, Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advanced Skin Wound Care* 25:349-370
32. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE (2009) Review - monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29:313-326
33. Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration* 13:7-12
34. Desmoulière A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *American Journal of Pathology* 146:56-66
35. Detmar M, Brown L, Berse B, Jackman R, Elicker B, Dvorak HF, Claffey KP (1997) Hypoxia regulates the expression of vascular permeability factor/vascular

- endothelial growth factor (VPF/VEGF) and its receptors in human skin. *Journal of Investigative Dermatology* 108:263-268
36. Dill-Müller D, Tilgen W (2005) Bewährte und aktuelle Verfahren in der Wundheilung. *Der Hautarzt* 56:411-422
 37. DiPietro LA (2013) Angiogenesis and scar formation in healing wounds. *Current Opinion of Rheumatology* 25:87 - 91
 38. Dohgu S, Banks WA (2013) Brain pericytes increase the lipopolysaccharide-enhanced transcytosis of HIV-1 free virus across the in vitro blood-brain barrier: evidence for cytokine-mediated pericyte-endothelial cell crosstalk. *Fluids and Barriers of the CNS* 10:1-10.
 39. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA (2000) Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvascular Research* 60:55-69
 40. Dore-Duffy P, Balabanova R, Beaumont T, Katar M (2005) The CNS pericyte response to low oxygen: early synthesis of cyclopentenone prostaglandins of the J-series. *Microvascular Research* 69:79-88
 41. Dore-Duffy P, La Manna JC (2007) Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxidants & Redox Signaling* 9:1363-1371
 42. Dore-Duffy P (2008) Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Current Pharmaceutical Design* 14:1581-1593
 43. Drinkwater SL, Burnand KG, Ding R, Smith A (2003) Increased but ineffectual angiogenic drive in nonhealing venous leg ulcers. *Journal of Vascular Surgery* 38:1106-1112
 44. Dulmovits BM, Herman IM (2012) Microvascular remodeling and wound healing: a role for pericytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44:1800-1812
 45. Eckers A, Haendeler J (2015) Endothelial cells in health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 22:1209-1211
 46. Ehrenreich M, Ruszczak Z (2006) Update on tissue-engineered biological dressings. *Tissue Engineering* 12:2407-2421
 47. Elliott CG, Hamilton, DW (2011) Deconstructing fibrosis research: do pro-fibrotic signals point the way for chronic dermal wound regeneration? *J. Cell Commun. Signal* 5:301-315.

48. Eming S, Kaufmann J, Löhner R, Krieg T (2007) Chronische Wunde: Neue Wege in Forschung und Therapie. *Der Hautarzt* 58: 939-944
49. Falanga V (2005) Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *Lancet* 366:1736-43
50. Fan K, Tang J, Escandon J, Kirsner RS (2011) State of the art in topical wound-healing products. *Plastic and Reconstructive Surgery* 127:44-59
51. Fatigati V, Murphy R (1984) Actin and tropomyosin variants in smooth muscles. *The Journal of Biological Chemistry* 259:14383-14388
52. Fisher JW (2003) Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Experimental Biology and Medicine* 228:1-14
53. Foley RN (2008) Erythropoietin: physiology and molecular mechanisms. *Heart Failure Reviews* 13:405-414
54. Fonder MA, Lazarus GS, Cowan DA, Aronson-Cook B, Kohli AR, Mamelak AJ (2008) Treating the chronic wound: a practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58:185-206
55. Friedl P, Wolf K (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *The Journal of Cell Biology* 188:11-19
56. Günter CI, Rezaeian F, Harder Y, Lohmeyer JA, Egert S, Bader A, Schilling AF, Machens HG (2013) Erythropoietin in der Plastischen Chirurgie. *Handchirurgie - Mikrochirurgie - Plastische Chirurgie* 45:108-119
57. Gabbiani G (2003) The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *Journal of Pathology* 200:500-503
58. Galiano RD, Tepper OM, Pelo CR, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG, Gurtner GC (2004) Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology* 164:1935-1947
59. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 31:13-20
60. Giri P, Ebert S, Braumann UD, Kremer M, Giri S, Machens HG, Bader A (2015) Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or

- topical application of recombinant human erythropoietin gel. *Drug Design, Development and Therapy* 9:2565-2579
61. Gonul E, Duz B, Kahraman S, Kayali H, Kubar A, Timurkaynak E (2002) Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvascular Research* 64: 116-119
 62. Gordillo GM, Bernatchez SF, Diegelmann R, DiPietro LA, Eriksson E, Hinz B, Hopf HW, Kirsner R, Liu P, Parnell LKS, Sandusky GE, Sen CK, Tomic-Canic M, Volk SW, Baird A (2013) Preclinical models of wound healing: is man the model? Proceedings of the wound healing society symposium. *Advances in Wound Care* 2:1-4
 63. Gosain A, DiPietro LA (2004) Aging and wound healing. *World Journal of Surgery* 28: 321-326
 64. Gottrup F, Ågren MS, Karlsmark T (2000) Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair and Regeneration* 8:83-96
 65. Greaves NS, Morris J, Benatar B, Alonso-Rasgado T, Baguneid M, Bayat A (2015) Acute cutaneous wounds treated with human decellularised dermis show enhanced angiogenesis during healing. *PLOS ONE* 10:1-18
 66. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Scheppke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresch DA (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* 456:809–813
 67. Guillemin GJ, Brew BJ (2004) Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* 75:1-10
 68. Guo S, DiPietro L (2010) Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research* 3:219-229
 69. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT (2008) Wound repair and regeneration. *Nature* 453:314-321
 70. Hardman MJ, Ashcroft GS (2008) Estrogen, not intrinsic aging, is the major regulator of delayed human wound healing in the elderly. *Genome Biology* 9:R80
 71. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (2003) A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *American Journal of Pathology* 163:993–1000

72. Herman IM, D'Amore PA (1985) Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *The Journal of Cell Biology* 101:43-52
73. Hewett PW, Murray CJ (1996) Coexpression of flt-1, flt-4 and KDR in freshly isolated and cultured human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications* 659:697-702
74. Hinz, B. (2007) Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *Journal of Investigative Dermatology* 127:526–537
75. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G (2012) Recent developments in myofibroblast biology paradigms for connective tissue remodeling. *American Journal of Pathology* 180:1340–1355
76. Hirschi KK, D'Amore PA (1996) Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular Research* 32:687-698
77. Holderfield MT, Hughes CC (2008) Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor- β in vascular morphogenesis. *Circulation Research* 102:637-652.
78. Hopf HW, Rollins MD (2007) Wounds: an overview of the role of oxygen. *Antioxidants & Redox Signaling* 9:1183-1184
79. Iacobazzi D, Garaeva I, Albertario A, Cherif M, Angelini GD, Caputo M, Ghorbel MT (2015) Protein phosphatase 1 beta is modulated by chronic hypoxia and involved in the angiogenic endothelial cell migration. *Cellular Physiology and Biochemistry* 36:384-394
80. Irrera N, Bitto A, Pizzino G, Vaccaro M, Squadrito F, Galeano M, Stagno d' Acontres F, Stagno d' Alcontres F, Buemi M, Minutoli L, Colonna MR, Altavilla D (2015) Epoetin alpha and epoetin zeta: a comparative study on stimulation of angiogenesis and wound repair in an experimental model of burn injury. *BioMed Research International* 2015(Article ID 968927):1-9
81. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL (1974) Synthesis of von willebrand factor by cultured human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 71:1906-1909
82. Janßen H, Becker R (2008) Qualität und Kosten in der chronischen Wundversorgung – Widerspruch oder vereinbar? *Orthopädie Technik* 12/08: 920-923

83. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvascular Research* 64:326-333
84. Johnston ST, Simpson MJ, McElwain SD (2014) How much information can be obtained from tracking the position of the leading edge in a scratch assay? *The Journal of the Royal Society* 11:1-9
85. Jones V, Grey JE, Harding KG (2006) ABC of wound healing wound dressings. *British Medical Journal* 332:777-780
86. Jozkowicz A, Huk I, Nigisch A, Weigel G, Weidinger F, Dulak J (2002) Effect of prostaglandin-J2 on VEGF synthesis depends on the induction of heme oxygenase-1. *Antioxidants & Redox Signaling* 4:577-585
87. Kadoya K, Fukushi J, Matsumoto Y, Yamaguchi Y, Stallcup WB (2008) NG2 proteoglycan expression in mouse skin: altered postnatal skin development in the NG2 null mouse. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 56:295-303
88. Khairoun M, van der Pol P, de Vries DK, Lievers E, Schlagwein N, de Boer HC, Bajema IM, Rotmans JI, van Zonneveld AJ, Rabelink TJ, van Kooten C, Reinders MEJ (2013) Renal ischemia-reperfusion induces a dysbalance of angiopoietins, accompanied by proliferation of pericytes and fibrosis. *American Journal of Physiology: Renal Physiology* 305:F901–F910
89. King A, Balaji S, Keswani SG, Crombleholme TM (2014) The role of stem cells in wound angiogenesis. *Advances in wound care* 3:614-625
90. Kirketerp-Møller K, Jensen PØ, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, Tolker-Nielsen T, Højby N, Givskov M, Bjarnsholt T (2008) Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *Journal of clinical Microbiology* 46:2717–2722
91. Kirkpatrick CJ, Krump-Konvalinkova V, Unger RE, Bittinger F, Otto M, Peters K (2002) Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular Engineering* 19:211-217
92. Ko J, Ross J, Awad H, Hurwitz H, Klitzman B (2005) The effects of ZD6474, an inhibitor of VEGF signaling, on cutaneous wound healing in mice 1. *Journal of Surgical Research* 129:251–259
93. Krüger U, Wolfrum F (2008) *Duale Reihe Chirurgie (3. Auflage Ausg.). (D. Henne-Bruns, M. Dürig, & B. Kremer, Hrsg.) Stuttgart: Thieme*
94. Kramann R, Humphreys BD (2014) Kidney pericytes: roles in regeneration and fibrosis. *Seminars in Nephrology* 34:374–383

95. Kujath P, Michelsen A (2008) Wunden – von der Physiologie zum Verband. *Deutsches Ärzteblatt* 105:239-248
96. Larregina AT, Watkins SC, Erdos G, Spencer LA, Storkus WJ, Beer Stolz D, Falo Jr LD (2001) Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells. *Gene Therapy* 8:608-617
97. Latifi-Pupovci H, Kuçi Z, Wehner S, Bönig H, Lieberz R, Klingebiel T, Bader P, Kuçi S (2015) In vitro migration and proliferation (“wound healing”) potential of mesenchymal stromal cells generated from human CD271 bone marrow mononuclear cells. *Journal of Translational Medicine* 13:2-9
98. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Percoraro RE, Rodeheaver G, Robson MC (1994) Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Wound Repair and Regeneration* 2:165 - 170
99. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV (2015) Von willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 125:2019-2028
100. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols* 2:329-333
101. Lindboe CF, Torp SH (2002) Comparison of ki-67 equivalent antibodies. *Journal of Clinical Pathology* 55:467-471
102. Loo AE, Halliwell B (2012) Effects of hydrogen peroxide in a keratinocyte-fibroblast co-culture model of wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423:253-258
103. Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD J, Chen YG (2007) MCP-1 mediates TGF- β -induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 109:987-994
104. Macri L, Clark R (2009) Tissue engineering for cutaneous wounds: selecting the proper time and space for growth factors, cells and the extracellular matrix. *Skin Pharmacol Physiol* 22:83-93
105. Maini PK, McElwain DS, Leavesley DI (2004) Traveling wave model to interpret a wound-healing cell migration assay for human peritoneal mesothelial cells. *Tissue Engineering* 10:475-482
106. Martin P (1997) Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81

107. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE (2005) Pathophysiology of chronic nonhealing wounds. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 26:306-319
108. Menke MN, Menke NB, Boardman CH, Diegelmann RF (2008) Biologic therapeutics and molecular profiling to optimize wound healing. *Gynecol Oncol* 111:87-91
109. Micallef L, Vedrenne N, Billet F, Coulomb B, Darby IA, Desmoulière A (2012) The myofibroblast, multiple origins for major roles in normal and pathological tissue repair. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 5:1-5
110. Monroe DM, Hoffman M (2012) The clotting system - a major player in wound healing. *Haemophilia*, 18:11-16
111. Moulin V, Larochelle S, Langlois C, Thibault I, Lopez-Vallé CA, Roy M (2004) Normal skin wound and hypertrophic scar myofibroblasts have differential responses to apoptotic inductors. *Journal of Cellular Physiology* 198:350-358
112. Mulder G, Tenenhaus M, D'Souza GF (2014) Reduction of diabetic foot ulcer healing times through use of advanced treatment modalities. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* 13:335-346
113. Mustoe T (2004) Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy. *The American Journal of Surgery* 187:65S-70S
114. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O (2006) Chronic wound pathogenesis and current treatment strategies: a unifying hypothesis. *Plastic and Reconstructive Surgery* 117:35-41
115. Mutschler W (2012) Physiologie und Pathophysiologie der Heilung von Defektwunden. *Unfallchirurg* 2012 115:767-773
116. Nehls V, Drenckhahn D (1993) The versatility of microvascular pericytes: from mesenchyme to smooth muscle? *Histochemistry* 99:1-12
117. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P (2009) Orthopädie und Unfallchirurgie (6. Auflage Ausg.). (Thieme, Hrsg.) Aachen, Wiesbaden, München
118. Nishiya D, Omura T, Shimada K, Matsumoto R, Kusuyama T, Enomoto S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J, Yoshiyama M (2006) Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of Pharmacological Sciences*, 101:31-39
119. Nissen NN, Poverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the

- proliferative phase of wound healing. *American Journal of Pathology* 152:1445-1452
120. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T (2007) A new in vitro wound model based on the co-culture of human dermal microvascular endothelial cells and human dermal fibroblasts. *Biology of the Cell* 99:197-207
 121. Oberringer M, Meins C, Bubel M, Pohlemann T (2008) In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor β 1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *Journal of Molecular Histology* 39:37-47
 122. Orlidge A, D'Amore PA (1987) Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *The Journal of Cell Biology* 105:1455-1462
 123. Ozerdem U, Stallcup WB (2004) Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis* 7:269-276
 124. Pan Q, Qiu WY, Huo YN, Yao YF, Lou MF (2011) Low levels of hydrogen peroxide stimulate corneal epithelial cell adhesion, migration, and wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:1723-1734
 125. Paquet-Fifield S, Schlüter H, Li A, Aitken T, Gangatirkar P, Blashki D, Koelmeyer R, Pouliot N, Palatsides M, Ellis S, Brouard N, Zannettino A, Saunders N, Thompson N, Li J, Kaur P (2009) A role for pericytes as microenvironmental regulators of human skin tissue regeneration. *The Journal of Clinical Investigation* 119:2795-2806
 126. Park TS, Gavina M, Chen CW, Sun B, Teng PN, Huard J, Deasy BM, Zimmerlin L, Péault B (2011) Placental perivascular cells for human muscle regeneration. *Stem Cells and Development* 20:451-463
 127. Peng H, Herzog EL (2012) Fibrocytes: emerging effector cells in chronic inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* 12:491-496
 128. Pichiule P, Chavez JC, LaManna, JC (2004) Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279:12171-12180
 129. Pober JS, Kluger MS, Schechner JS (2001) Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 941:12-25
 130. Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465

131. Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326:1208-1212
132. Pschyrembel W (2004) Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch (260. Auflage Ausg.). (W. d. Gruyter, Hrsg.) Berlin: de Gruyter
133. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT (2006) Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54:385-395
134. Qi Y, Jiang D, Sindrilaru A, Stegemann A, Schatz S, Treiber N, Rojewski M, Schrezenmeier H, Vander Beken S, Wlaschek M, Böhm M, Seitz A, Scholz N, Dürselen L, Brinckmann J, Ignatius A, Scharffetter-Kochanek K (2013) TSG-6 released from intradermally injected mesenchymal stem cells accelerates wound healing and reduces tissue fibrosis in murine full-thickness skin wounds. *Journal of Investigative Dermatology* 134:526-537
135. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK (2005) Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing 4:138–144
136. Ribatti D, Presta M, Vacca A, Ria R, Giuliani R, Dell'Era P, Nico B, Roncali L, Dammacco (1999) Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood* 93:2627-2636
137. Riedel K, Ryssel H, Koellensperger E, Germann G, Kremer T (2008) Pathophysiologie der chronischen Wunde. *Chirurg* 2008 79:526-534
138. Romani de Wit T, Rondaij MG, Hordijk PL, Voorberg J, van Mourik JA (2003) Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of weibel-palade bodies. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23:755-761
139. Romano Di Peppe S, Mangoni A, Zambruno G, Spinetti G, Melillo G, Napolitano M, Capogrossi MC (2002) Adenovirus-mediated VEGF165 gene transfer enhances wound healing by promoting angiogenesis in CD1 diabetic mice. *Gene Therapy* 9:1271-1277
140. Rose DS, Maddox PH, Brown DC (1994) Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *Journal of Clinical Pathology* 47:1010-1014
141. Rovee DT (1991) Evolution of wound dressings and their effects on the healing process. *Clinical Materials* 8:183 - 187

142. Sadler JE (2009) Low von willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology* 108:112
143. Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA (1996) Modulation of transforming growth factor β receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 97:1436–1446
144. Sato Y, Rifkin DB (1988) Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DNA synthesis. *The Journal of Cell Biology* 107:1199-1205
145. Sato Y, Rifkin DB (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor- β 1-like molecule by plasmin during co-culture. *The Journal of Cell Biology* 109:309-315
146. Sayan H, Guven A, Aktas G, Ozacmak D (2006) Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *Journal of Investigative Surgery* 19:163–173
147. Scharffetter-Kochanek K, Lange TS, Kirchberg K (1994) Wundheilung – Wundverschluß: Theorie und Praxis, chirurgische und konservative Maßnahmen, Fortschritte der operativen und onkologischen Dermatologie (Bd. 8). (G. Mahrle, H.-J. Schulze, & T. Krieg, Hrsg.) *Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln, Joseph-Stelzmann-Straße 9, D-50924 Köln, Deutschland: Springer-Verlag Berlin Heidelberg*
148. Schmitz K, Jennewein M, Pohlemann T, Seekamp A, Oberringer M (2011) Reoxygenation attenuates the adhesion of neutrophils to microvascular endothelial cells. *Angiology* 62:155-162
149. Scholzen T, Gerdes J (2000) The ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182:311-322
150. Schwarz F, Jennewein M, Bubel M, Holstein JH, Pohlemann T, Oberringer M (2013) Soft tissue fibroblasts from well healing and chronic human wounds show different rates of myofibroblasts in vitro. *Molecular Biology Reports* 40:1721-1733
151. Shepro D, Morel NM (1993) Pericyte physiology. *The FASEB Journal* 7:1031-1038
152. Sims DE (1986) The pericyte - a review. *Tissue & Cell* 18:153-174
153. Sims DE (2000) Diversity within pericytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 27:842-846
154. Singer AJ, Clark RAF (1999) Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine* 341:738-746

155. Sinno H, Prakash S (2013) Complements and the wound healing cascade: an updated review. *Plastic Surgery International* 2013:1-3
156. Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L (1989) α -smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37:315-321
157. Smith P, Cáceres M, Martínez C, Oyarzún A, Martínez J (2014) Gingival wound healing: an essential response disturbed by aging? *Journal of Dental Research* 1-8
158. Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR (1998) Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery* 176:26-38
159. Steinberger M, Wolfskeil M, Lenz S, Lensen A, Wagner FM, Käsela M (2011) Artikelmagazin - Das Online Magazin. Abgerufen am 24. Juni 2015 von www.artikelmagazin.de:
<http://www.artikelmagazin.de/gesundheit/ratgeber/von-der-akuten-erkrankung-bis-zum-chronischen-leiden.html>
160. Steinbrech D, Mehrara B, Chau D, Rowe N, Chin G, Lee T, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT (1999) Hypoxia upregulates VEGF production in keloid fibroblasts. *Annals of Plastic Surgery* 42:514-519
161. Steinstraesser L, Sorkin M, Niederbichler AD, Becerikli M, Stupka J, Daigeler A, Kesting MR, Stricker I, Jacobsen F, Schulte M (2010) A novel human skin chamber model to study wound infection ex vivo. *Archives of Dermatological Research* 302:357-365
162. Stratman AN, Malotte KM, Mahan RD, Davis MJ, Davis GE (2009) Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* 114:5091-5101
163. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA (2014) Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science* 346:941-945
164. Syeda MM, Jing X, Mirza RH, Yu H, Sellers RS, Chi Y (2012) Prostaglandin transporter modulates wound healing in diabetes by regulating prostaglandin-induced angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 181:334-346
165. Takamura Y, Tomomatsu T, Kubo E, Tsuzuki S, Akagi Y (2008) Role of the polyol pathway in high glucose-induced apoptosis of retinal pericytes and proliferation of endothelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:3216-3223

166. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa T, Harada E, Miyaji H, Koga M, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y (2011) Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *Journal of Neuroinflammation* 8:1-12
167. Tarallo S, Beltramo E, Berrone E, Porta M (2012) Human pericyte–endothelial cell interactions in co-culture models mimicking the diabetic retinal microvascular environment. *Acta Diabetologica* 49:141-151
168. Tilton RG, Kilo C, Williamson JR, Murch DW (1979) Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvascular Research* 18:336-352
169. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* 3:349-363
170. Tricco AC, Antony J, Vafaei A, Khan PA, Harrington A, Cogo E, Wilson C, Perrier L, Hui W, Straus SE (2015) Seeking effective interventions to treat complex wounds: an overview of systematic reviews. *BMC Medicine* 13:1-23
171. Unger RE, Krump-Konvalinkova V, Peters K, Kirkpatrick CJ (2002) In vitro expression of the endothelial phenotype: comparative study of primary isolated cells and cell lines, including the novel cell line HPMEC-ST1.6R. *Microvascular Research* 64:384-397
172. Vandekerckhove J, Weber K (1978) At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of Molecular Biology* 126:783-802
173. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research* 37:1528-1542
174. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* 198:971–975
175. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL (2004) Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine Reviews* 25:612–628

176. Wagner DD, Marder VJ (1984) Biosynthesis of von willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *The Journal of Cell Biology* 99:2123-2130
177. Walshe TE, Connell P, Cryan L, Ferguson G, Gardiner T, Morrow D, Redmond EM, O'Brien C, Cahill PA (2011) Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis in vitro: role of hedgehog and notch signaling. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52:4472-4483
178. Wang Q, Pfister F, Dorn-Beineke A, vom Hagen F, Lin J, Feng Y, Hammes HP (2010) Low-dose erythropoietin inhibits oxidative stress and early vascular changes in the experimental diabetic retina. *Diabetologia* 53:1227–1238
179. Watanabe D, Suzuma K, Matsui S, Kurimoto M, Kiryu J, Kita M, Suzuma I, Ohashi H, Ojima T, Murakami T, Kobayashi T, Masuda S, Nagao M, Yoshimura N, Takagi H (2005) Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy. *The New England Journal of Medicine* 353:782-92.
180. Waters JP, Kluger MS, Graham M, Chang WG, Bradley JR, Pober JS (2013) In vitro self-assembly of human pericyte-supported endothelial microvessels in three-dimensional co-culture: a simple model for interrogating endothelial:pericyte interactions. *Journal of Vascular Research* 50:1-13.
181. Wei Y, Chen F, Zhang T, Chen D, Jia X, Wang J, Guo W, Chen J (2015) A tubing-free microfluidic wound healing assay enabling the quantification of vascular smooth muscle cell migration. *Scientific Reports* 5:1-11
182. Werdin F, Tennenhaus M, Schaller HE, Rennekampff HO (2009) Evidence-based management strategies for treatment of chronic wounds. *Journal of plastic Surgery* 9:169-179
183. Wild T, Auböck J (Hrsg.) (2007) *Manual der modernen Wundbehandlung - Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung (1 Ausg.)*. Wien, Österreich: Springer-Verlag/Wien
184. Wilson JA, Clark JJ (2004) Obesity: impediment to postsurgical wound healing. *Advances in Skin & Wound Care* 17:426-435
185. Xie L, Chesterman CN, Hogg PJ (2000) Reduction of von willebrand factor by endothelial cells. *Thrombosis and Haemostasis* 84:506-513
186. Xie P, Jia S, Tye R, Chavez-Munoz C, Vracar-Grabar M, Hong SJ, Galiano R, Mustoe TA (2014) Systemic administration of hemoglobin improves ischemic wound healing. *Journal of Surgical Research* 194:696 - 705

187. Xu W, Hong SJ, Jia S, Zhao Y, Galiano RD, Mustoe TA (2012) Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. *Laboratory Investigation* 92:584-599
188. Xueyong L, Shaozong C, Wangzhou L, Yuejun L, Xiaoxing L, Jing L, Yanli W, Jinqing L (2008) Differentiation of the pericyte in wound healing: the precursor, the process, and the role of the vascular endothelial cell. *Wound Repair and Regeneration* 16:346-355
189. Yager DR, Nwomeh BC (1999) The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regeneration* 7:433-441
190. Yao Y, Tsirka SE (2014) Monocyte chemoattractant protein-1 and blood-brain barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71:683-697
191. Yazdanpanah L, Nasiri M, Adarvishi S (2015) Literature review on the management of diabetic foot ulcer. *World Journal of Diabetes* 6:37-53
192. Yin J, Lu J, Yu FSX (2008) Role of small GTPase rho in regulating corneal epithelial wound healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49:900-909
193. You HJ, Han SK (2014) Cell therapy for wound healing. *Journal of Korean Medical Science* 29:311-319

Publikationen

Vortrag:

Schneider G, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M (2014) Erythropoietin in a new in vitro endothelial cell-pericyte assay for soft tissue healing. 18. Chirurgische Forschungstage (09-11.10.2014); Medizinische Hochschule Hannover

Artikel:

Schneider G, Bubel M, Pohlemann T, Oberringer M (2015) Response of endothelial cells and pericytes to hypoxia and erythropoietin in a co-culture assay dedicated to soft tissue repair. Mol and Cell Biochem 407:29-40

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all den Menschen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Tim Pohlemann für die Bereitstellung der Räumlichkeiten, Geräte und Verbrauchsmaterialien im molekularbiologischen Labor der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie aussprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. (apl.) Dr. rer. nat. Martin Oberringer für das Heranführen an die wissenschaftliche Thematik und Methodik und die sehr gute und lehrreiche Betreuung während der gesamten Zeit meiner Arbeit. Ich danke ihm für jede wertvolle Diskussion, seine große Geduld und seine ständige und zügige Hilfsbereitschaft.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des molekular- und zellbiologischen Forschungslabors für ihre freundliche Zusammenarbeit bedanken. Insbesondere danke ich Martina Jennewein, Silke Guthörl und Monika Bubel für die zahlreichen Anregungen und die sehr gute technische Unterstützung.

Ein ganz herzlicher Dank gebührt meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld, Motivation und Unterstützung auf jede erdenkliche Art und Weise.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und darüber hinaus immer an mich geglaubt haben.